

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Die Rolle von E6-Onkoprotein, p53, p53 mutiert, p16, MDM2 und  
Galektin-3  
beim Zervixkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Annika Barbara Amelie Stiasny

aus

Fürth in Bayern

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	PD Dr. Oliver Stötzer
	Prof. Dr. Eva-Maria Grischke
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Bernd Kost
Dekan:	Prof. Dr. med. dent Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	14.03.2018

*„ Im Grunde sind es doch die Verbindungen mit Menschen, die dem Leben  
seinen Wert geben.“*

(Wilhelm von Humboldt)

Für meine Familie, deren Liebe und Unterstützung ich mir immer sicher sein kann und für die Menschen, denen ich begegnete und die mein Leben reicher machten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	S.001
<b>2. Einleitung</b>	S.003
<b>2.1 Das Zervixkarzinom</b>	S.003
2.1.1. Epidemiologie	S.003
2.1.2 Anatomische Grundlagen	S.005
2.1.3 Physiologischer histologischer Aufbau der Cervix uteri	S.007
2.1.3.1 Definition: Squamocolumnar Junction (SCJ) und Transformationszone (TZ)	S.007
2.1.4 Risikofaktoren	S.008
2.1.4.1. Humane Papillomaviren (HPV)	S.008
2.1.4.1.1 Persistierende Infektion mit HPV	S.008
2.1.4.1.2 Clearance der HPV-Infektion	S.009
2.1.4.1.3 HPV-Prävalenz	S.010
2.1.4.1.4 Aufbau Humaner Papillomaviren (HPV)	S.012
2.1.4.1.5 Nomenklatur Humaner Papillomaviren (HPV)	S.013
2.1.4.1.6 Replikation Humaner Papillomaviren (HPV)	S.016
2.1.4.2 Weitere Risikofaktoren	S.017
2.1.4.2.1 Sexualverhalten	S.017
2.1.4.2.2 Orale Kontrazeptiva	S.018
2.1.4.2.3 Rauchen	S.018
2.1.4.2.4 Schwangerschaft	S.020
2.1.4.2.5 Sexuell übertragene Infektionen	S.020
2.1.4.2.6 Bildungsniveau	S.021

2.1.5 Bedeutung der Transformationszone (TZ) bei der Kancerogenese	S.021
2.1.5.1 Verschiebung der Transformationszone (TZ)	S.022
2.1.6 Klassifikation der Dysplasien der Zervix	S.024
2.1.6.1 Präkanzerosen der Zervix	S.024
2.1.6.1.1 Präkanzerosen des Plattenepithels: Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN) (squamous intraepithelial lesion (SIL))	S.024
2.1.6.1.2 Präkanzerosen des Drüsenepithels: Zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie (CGIN) (cervical glandular intraepithelial Neoplasia (CGIN))	S.026
2.1.6.2 Maligne Tumore der Zervix	S.027
2.1.6.2.1 Plattenepithelkarzinom	S.028
2.1.6.2.2 Adenokarzinom	S.029
2.1.7 Kancerogenese	S.030
2.1.7.1 Karzinomentwicklung über Vorstufen	S.030
<b>3. Fragestellung</b>	S.031
<b>4. Patientenkollektiv, Material und Methoden</b>	S.032
<b>4.1 Patientenkollektiv</b>	S.032
<b>4.2 Materialien</b>	S.034
4.2.1 Geräte	S.034
4.2.2. Verbrauchsmaterialien	S.035
4.2.2.1 Anzusetzende Lösungen	S.036
4.2.3 Primärantikörper	S.037
<b>4.3 Methoden</b>	S.038

4.3.1 Immunhistochemie	S.038
4.3.1.1 Definition Immunhistochemie	S.038
4.3.1.2 Definition Antikörper	S.038
4.3.1.3 Vorbereitung des immunhistochemisch zu färbenden Gewebes	S.039
4.3.1.4 Prinzipieller Ablauf einer immunhistochemischen Färbung	S.039
4.3.1.5 Spezielle Abläufe der immunhistochemischen Färbungen mit den verwendeten Primärantikörpern p53, p53 mutiert, E6, MDM2, Galektin-3 und p16	S.043
4.3.1.6 Positivkontrollen	S.046
4.3.1.7 Auswertung mittels IRS Score	S.046
4.3.1.8 Statistische Auswertung	S.047
<b>5. Ergebnisse</b>	S.048
<b>5.1 Expression von E6</b>	S.048
5.1.1 E6 und T-Status	S.048
5.1.2 E6 und FIGO-Stadium	S.050
5.1.3 E6 und histologischer Subtyp	S.054
<b>5.2 Expression von p53</b>	S.056
5.2.1 p53 im Kern und histologischer Subtyp	S.056
5.2.2 p53 im Zytoplasma und histologischer Subtyp	S.058
<b>5.3 Expression von p53 mutiert</b>	S.060
5.3.1 Nukleäre Expression von p53 mutiert: Überlebensvorteil gegenüber keiner nukleären Expression	S.060
5.3.2 p53 mutiert und histologischer Subtyp	S.062
<b>5.4. Expression von p16</b>	S.064
<b>5.5 Positive Korrelation zwischen MDM2 und Galektin-3</b>	S.066
<b>5.6 Negative Korrelation zwischen E6 und p53 mutiert</b>	S.069

<b>5.7 Galektin-3: negativer Prognosefaktor bei p16-negativen Fällen</b>	S.072
<b>6. Diskussion</b>	S.073
<b>7. Schlussfolgerung</b>	S.085
<b>8. Verzeichnis der Abkürzungen, Akronyme und Symbole</b>	S.086
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	S.089
<b>10. Abbildungsverzeichnis</b>	S.103
<b>11. Tabellenverzeichnis</b>	S.108
<b>12. Veröffentlichungen und Kongressbeitrag</b>	S.109
<b>13. Lebenslauf</b>	S.110
<b>14. Danksagung</b>	S.112
<b>15. Eidesstattliche Versicherung</b>	S.114

# 1. Zusammenfassung

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (1). In Deutschland erkrankten 2010 etwa 4660 Frauen neu an Gebärmutterhalskrebs, damit machte das Zervixkarzinom 2,1% der Krebsneuerkrankungen bei Frauen in diesem Jahr aus (2). Man weiß, dass die persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV) die Hauptursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist (3-6). Humane Papillomaviren sind zur Replikation auf eine Wirtszelle angewiesen (7). Beginnt die infizierte Keratinozyte damit sich zu differenzieren, werden alle viralen Gene, auch E6 und E7 stark exprimiert (8). Das E6-Onkoprotein kann an p53 binden (9, 10) und dadurch den Abbau von p53 stimulieren (11). p53 ist ein Tumorsuppressor (12), d.h. im Fall von DNA-Schäden ist p53 dafür verantwortlich, entweder das Voranschreiten des Zellzyklus zu unterbrechen, indem es zu einem Zell-Zyklus-Arrest in der G1-Phase führt (13, 14), DNA-Reparatur-Mechanismen zu aktivieren (15), oder die Apoptose einzuleiten (12, 16, 17). Unter normalen Bedingungen wird p53 eng durch MDM2 über eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife kontrolliert (12, 16, 18). Das E7-Onkoprotein führt zum Abbau von pRb (Retinoblastomprotein), das ebenfalls ein Tumorsuppressorprotein ist (19-24). Durch die Inaktivierung von pRb durch E7 kommt es zu einer Überexpression von p16 (25, 26), weshalb der immunhistochemische Nachweis von p16 als Marker für HPV-assoziierte dysplastische und maligne zervikale Läsionen dient (27, 28). Galektin-3 spielt u.a. eine Rolle bei der Tumormetastasierung, indem es die Angiogenese induziert, an  $\alpha 1$ -und  $\beta 1$ -Integrin bindet und deren Expression hochreguliert (29-31). Darüberhinaus beeinflusst Galektin-3 die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort: Galektin-3 induziert die T-Zell-Apoptose und schränkt die T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion durch Bildung von Komplexen mit auf dem T-Zell-Rezeptor vorhandenen Glykanen ein (29, 32, 33). Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von 250 Paraffinschnitten (nur 248 waren auswertbar) von Zervixkarzinomen immunhistochemisch die Expression von E6, p53, einer mutierten Form von p53, p16, MDM2 und Galektin-3 untersucht und diese in Beziehung zu verschiedenen klinischen Parametern gesetzt. Außerdem untersuchten wir, ob die vermehrte Expression eines Proteins einen Überlebensvorteil bedeutet und ob die Expressionen der verschiedenen Proteine untereinander positiv bzw. negativ korrelieren. Anfänglich sollte auch die Expression des E7-Onkoproteins untersucht werden, was letztendlich aufgegeben werden musste, da zwar ein immunhistochemisches Färbeprotokoll für den E7-Antikörper der Firma Chemicon



(Nr. MAB 8680, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erarbeitet werden konnte, welches zu spezifischen Färbeergebnissen führte, aber die Produktion des betreffenden Antikörpers eingestellt wurde. Es konnte trotz zahlreicher Bemühungen kein adäquater Ersatz gefunden werden. Es zeigte sich, dass ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Expression des E6-Onkoproteins und dem T-Status, sowie der FIGO-Klassifikation besteht. Außerdem exprimierten die beiden Karzinomtypen (Plattenepithel- und Adenokarzinom) E6 im Zytoplasma unterschiedlich stark. Was die Expression von p53 betrifft, so ergaben sich ebenfalls unterschiedlich hohe Proteinlevel für die Plattenepithel- und Adenokarzinome, sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma. Bezüglich der mutierten Form von p53 konnten wir feststellen, dass die Expression dieses Proteins im Kern einen Überlebensvorteil bedeutet und dass Plattenepithelkarzinome dieses stärker exprimierten als Adenokarzinome. Darüberhinaus zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation zwischen E6 und der mutierten Form von p53, d.h. Karzinome mit niedriger zytoplasmatischer Expression des E6-Onkoproteins wiesen eine hohe zytoplasmatische Expression der mutierten Form von p53 auf und umgekehrt. Auch für die p16-Expression zeigte sich ein Unterschied zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinom. Außerdem fanden wir heraus, dass zwischen den Expressionen von MDM2 und Galektin-3 eine signifikante, positive Korrelation besteht. Zu Galektin-3 ist noch zu sagen, dass dessen Expression bei p16-negativen Patientinnen mit schlechtem Überleben in Verbindung steht. HPV-Infektionen der Zervix werden durch Polymerasekettenreaktionen (PCR) (34-36), in-situ-Hybridisierung (35-38) und durch p16-Immunhistochemie (27, 28, 36, 39) nachgewiesen. Ich bin der Meinung, dass man - unter Befolgung des von mir erarbeiteten immunhistochemischen Färbeprotokolls für den E6 Antikörper von Abcam (Cambridge, UK) - spezifische Färbungen erhält, anhand derer sich direkt und relativ kostengünstig Aussagen über die Expression des E6-Onkoproteins und damit über eine mögliche HPV-Infektion treffen lassen.

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Zervixkarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (1). Die höchsten Inzidenzraten weltweit finden sich in Ost-, West- und Südafrika, Süd-Zentralasien und Südamerika, die niedrigsten in Westasien, Australien/Neuseeland und Nordamerika (40). Im Jahr 2012 erkrankten 528 000 Frauen neu an Gebärmutterhalskrebs, circa 85% der Fälle traten in wenig entwickelten Regionen der Welt auf (41). Eine Ungleichverteilung ist auch im Bezug auf die mit dem Zervixkarzinom im Zusammenhang stehenden Todesfälle zu erkennen: 2012 starben weltweit 266 000 Frauen, wovon 231 000 aus Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen stammten (41). Als Hauptursache für diese Diskrepanz wird der Mangel an oder der Nichtzugang zu Präventionsmaßnahmen und Vorsorgeuntersuchungen angesehen, wodurch die Erkrankung häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und somit eine effektive Therapie erschwert wird (41).

In Deutschland erkrankten 2010 etwa 4660 Frauen neu an Gebärmutterhalskrebs, damit machte das Zervixkarzinom 2,1% der Krebsneuerkrankungen bei Frauen in diesem Jahr aus (2).

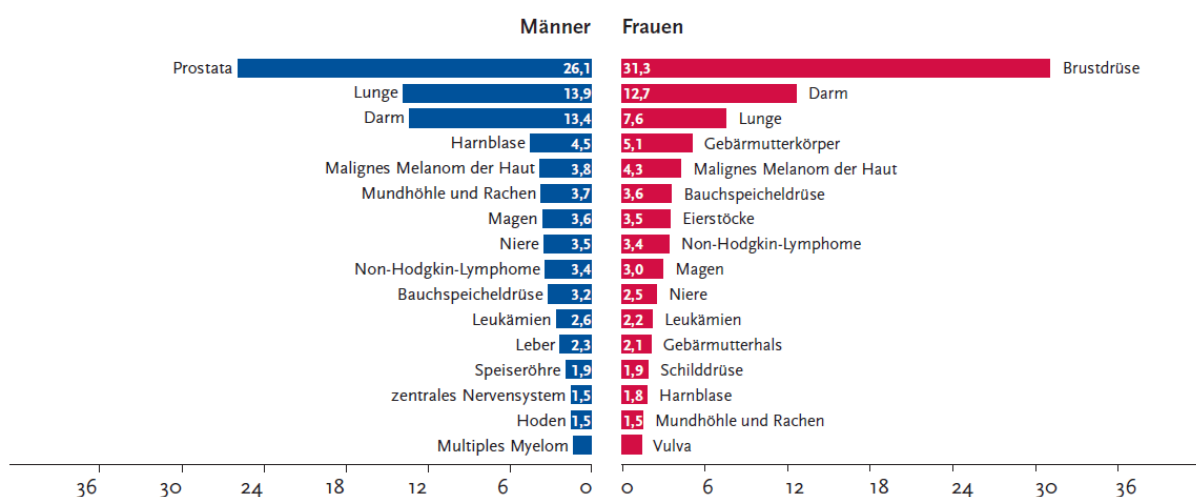


Abbildung 1 (2): Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)

Betrachtet man die Zahl der Krebs-assoziierten Todesfälle in Deutschland, starben 2010 1524 Patientinnen an Gebärmutterhalskrebs, was 1,5% der Krebssterbefälle entspricht (2). Bezogen auf den Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen liegt das Zervixkarzinom an sechzehnter Stelle, bezogen auf die geschlechtsspezifischen Tumorlokalisationen an vierter Stelle (2).

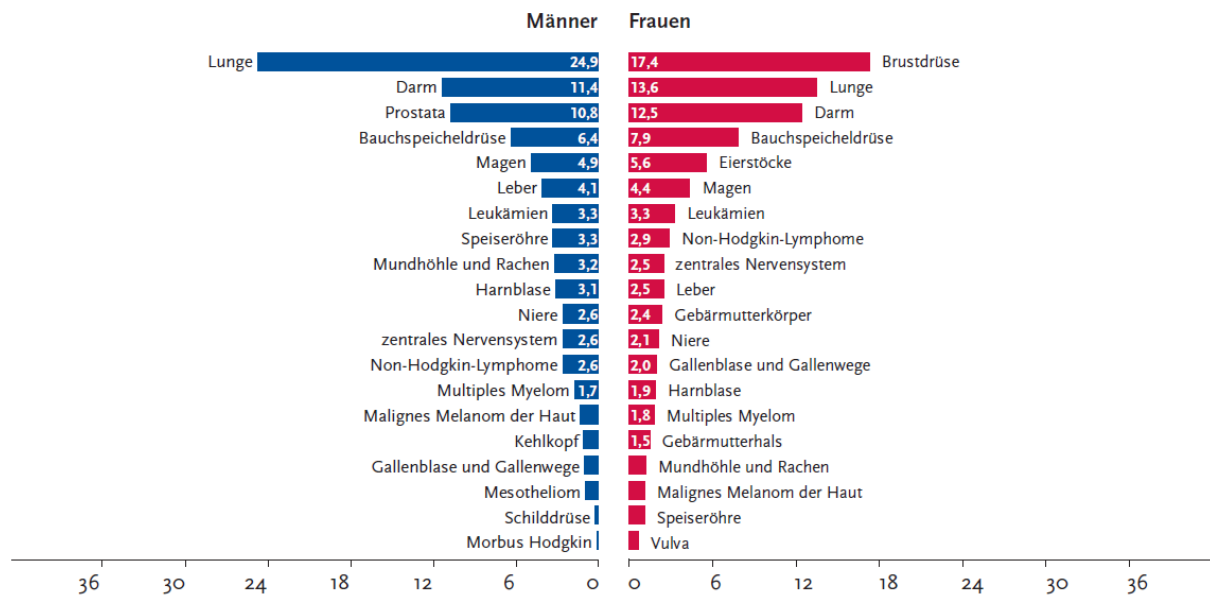


Abbildung 2 (2): Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010

Ungefähr 75% der Zervixkarzinome gehen vom Plattenepithel aus, circa 20% werden den Adenokarzinomen zugeordnet (2). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist 69% (2). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beim invasiven Karzinom beträgt 53 Jahre (2).

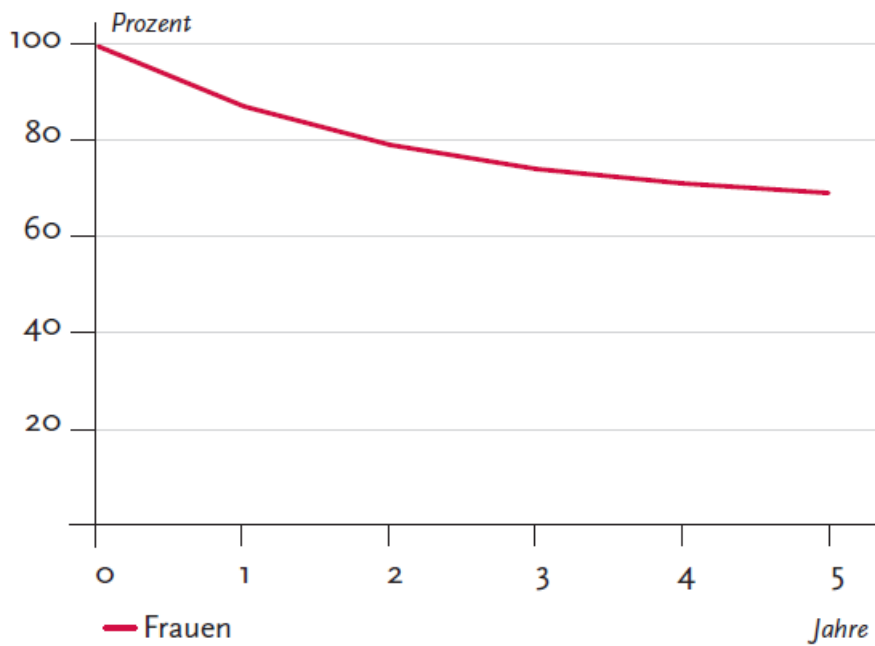


Abbildung 3 (2): Relative Überlebensraten bis 5 Jahre nach Erstdiagnose, ICD-10 C53, Deutschland 2009-2010

### 2.1.2 Anatomische Grundlagen

Die weibliche Gebärmutter, der Uterus, ist in etwa 7,5 cm lang, besteht hauptsächlich aus Muskulatur und ist im kleinen Becken lokalisiert (42). Ihre Funktion besteht in der Implantation der befruchteten Eizelle und der Ernährung des sich entwickelnden Keimes (42). Während der Geburt wird das Kind durch die Gebärmutter ausgetrieben (42). Der weibliche Uterus lässt sich in drei große Teile gliedern: Corpus uteri (Uteruskörper), Isthmus uteri (Zwischenstück) und Cervix uteri (Uterushals) (43-46). Die Cervix uteri wird eingeteilt in die Portio supravaginalis und in die Portio vaginalis (43, 45). Die Portio supravaginalis, der Teil der Cervix uteri oberhalb der Vagina, wird auch Endozervix genannt, die Portio vaginalis heißt auch Ektozervix oder Exozervix und ragt in die Vagina hinein (44, 46, 47).

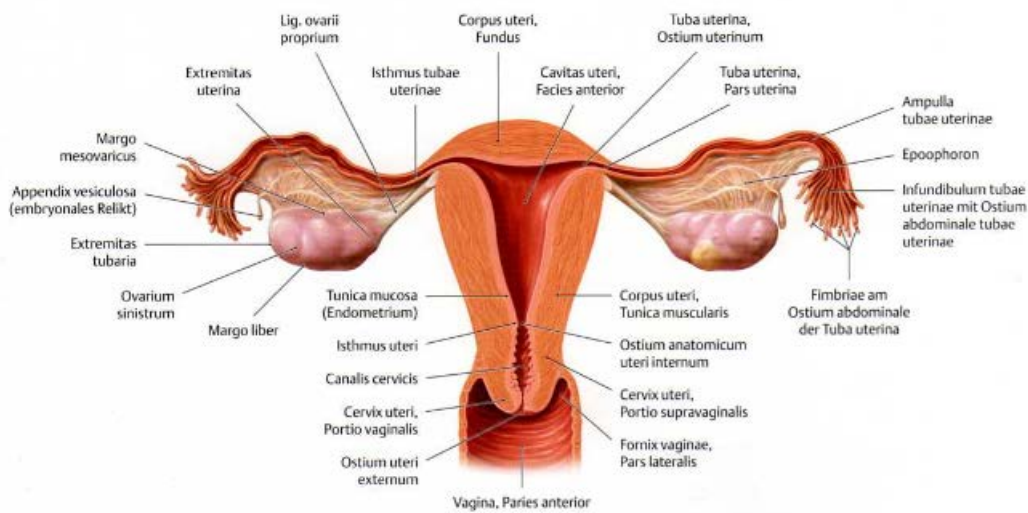


Abbildung 4 (45) S. 247: Uterus und Tubae uterinae: Form und Aufbau

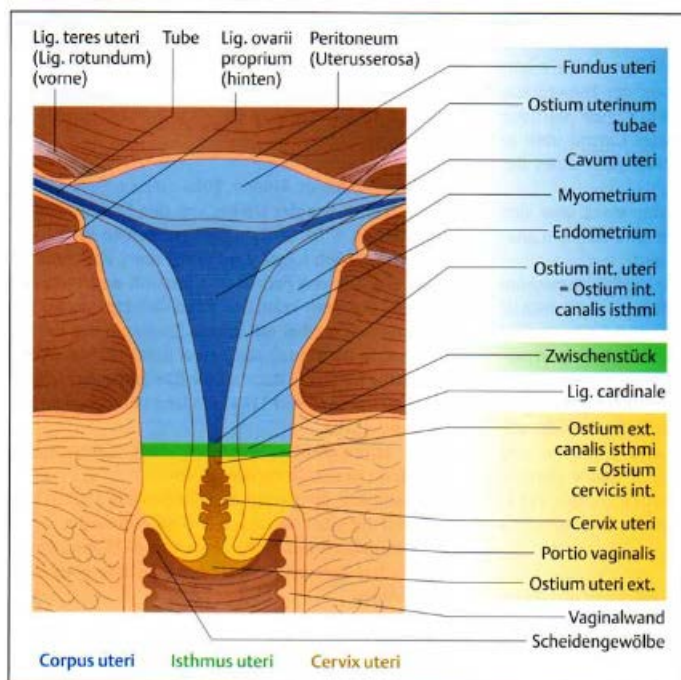


Abbildung 5 (43) S. 19: Frontalschnitt durch den Uterus

### 2.1.3 Physiologischer histologischer Aufbau der Cervix uteri

Die Zervix besteht aus Muskulatur, elastischem und fibrösem Bindegewebe und wird von unverhorntem Plattenepithel und Zylinderepithel ausgekleidet (46). Das einschichtige, Mucin sezernierende Zylinderepithel findet sich im Bereich der Endozervix, das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel (stratum basale, stratum spinosum, stratum superficiale) im Bereich der Exozervix (46, 48-50).

#### 2.1.3.1 Definition: Squamocolumnar Junction (SCJ) und Transformationszone (TZ)

Die Stelle, an der Platten- und Zylinderepithel aufeinander treffen, wird als die „Squamocolumnar Junction“ (SCJ) bezeichnet (46, 49, 51). Unter Transformationszone (TZ) versteht man die Region, in der endozervikales Zylinderepithel durch metaplastisch entstandenes Plattenepithel ersetzt wird (49, 52). Somit sind „Squamocolumnar Junction“ und Transformationszone nicht dasselbe, aber die SCJ ist Teil der TZ (53).

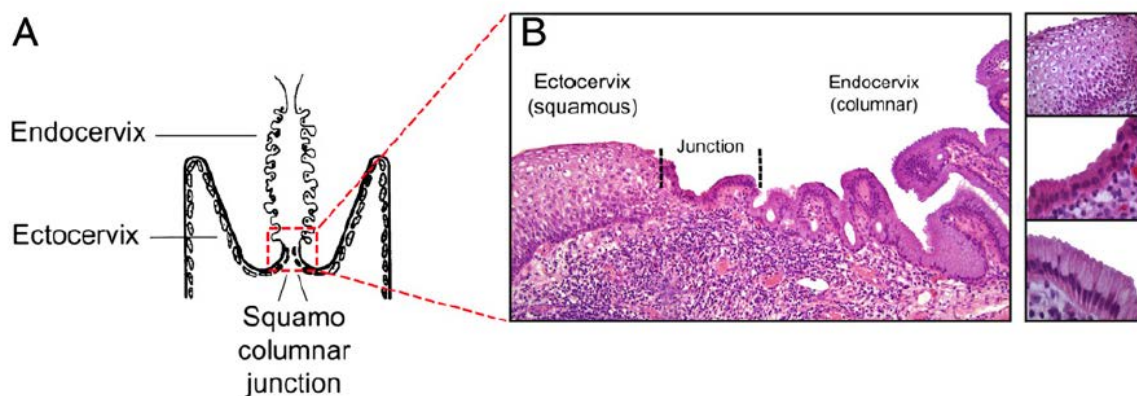


Abbildung 6 (52):

A: Position von Endozervix (Endocervix), Ektozervix (Ectocervix) und „Squamocolumnar junction“ auf der Zervix

B: histologische Darstellung der Epithelien im Bereich der Ektozervix (Ectocervix)

(Plattenepithelzellen) (squamous), der Endozervix (Endocervix) (Zylinderepithelzellen)

(columnar) und der Kontaktstelle (Junction)

## 2.1.4. Risikofaktoren

### 2.1.4.1 Humane Papillomaviren (HPV)

#### 2.1.4.1.1 Persistierende Infektion mit HPV

Die persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren ist die Hauptursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms (3-6). Walboomers et al kamen 1999 zu dem Ergebnis, dass die weltweite HPV-Prävalenz Zervixkarzinome betreffend bei 99,7% liegt, HPV kann somit in fast allen Karzinomen nachgewiesen werden (54). Munoz et al veröffentlichten 2004 ein ähnliches Ergebnis: 92,5% der 3085 Fälle waren HPV-positiv, lässt man die Proben, die mit einer weniger sensitiven Methode untersucht wurden weg, lag die Prävalenz bei 96,2% (55). Dabei konnten 30 verschiedene HPV-Typen nachgewiesen werden, deren Verteilung sich, beginnend mit dem häufigsten Typ, folgendermaßen darstellte:

HPV 16: 57,4%, HPV 18: 16,6 %, HPV 45: 6,8%, HPV 31: 4,3%, HPV 33: 3,7%,

HPV 52: 2,5%, HPV 58: 2,3%, HPV 35: 2,2%, HPV 59: 1,5%, HPV 56: 1,3%,

HPV 39: 1,2%, HPV 51: 1,1%, HPV 73: 0,6%, HPV 68: 0,5%, HPV 66: 0,5%, andere HPV-Typen: 1,9% und untypisierte HPV-Typen: 4,4% (55). HPV-Typ 16 wurde häufiger in Plattenepithelkarzinomen (54,4%), als in Adenokarzinomen (41,6%) nachgewiesen, bei

Typ 18 verhält es sich konträr (55). Das Ergebnis der Veröffentlichung aus dem Jahr 2003 ging in dieselbe Richtung: HPV-DNA konnte in 1739 von 1918 Zervix-Karzinom-Patientinnen nachgewiesen werden, was 90,7% entspricht (56). Auch Bosch et al wiesen die hohe HPV-Prävalenz nach (57). Ihre Analysen erfolgten an 932 Zervix-Karzinom-Fällen aus Afrika, Zentral-und Südamerika, Südostasien, Nordamerika und Europa (57). Es zeigte sich, dass 92,9% der Proben HPV-positiv waren (57). In einer Metaanalyse, die 85 Studien aus verschiedene Kontinenten umfasst, demonstrierten Clifford et al ebenfalls die hohe HPV-Prävalenz beim invasiven Zervixkarzinom: in Afrika (6 Studien, 609 Fälle) lag die HPV-Prävalenz bei 86,5%, in Asien (28 Studien, 3091 Fälle) bei 79,3%, in Europa (32 Studien, 3336 Fälle) bei 86,7%, in Nordamerika und Australien (13 Studien, 1562 Fälle) bei 88,1% und in Süd-und Zentralamerika (12 Studien, 1460 Fälle) bei 87,7% (58). Die Gesamtzahl der Fälle lag hiermit bei 10 058 (58). Virale DNA konnte auch in den Vorstufen eines invasiven Karzinoms, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien CIN I, CIN II und CIN III nachgewiesen werden (5, 59).

#### 2.1.4.1.2 Clearance der HPV-Infektion

In den meisten Fällen ist eine HPV-Infektion nicht dauerhaft, sondern vorübergehend (60). Ho et al untersuchten 608 College-Studentinnen in 6-Monats-Intervallen über 3 Jahre hinweg und kamen zu dem Ergebnis, dass die mittlere Dauer einer HPV-Infektion bei 8 Monaten lag (61). Nach 12 Monaten waren bereits 70% der Frauen nicht mehr infiziert, nach 24 Monaten sogar 91% (61). Die HPV-Infektionen, die 6 Monate und länger andauerten, konnten mit höherem Alter der Probandinnen, bestimmten HPV-Typen und dem Vorhandensein mehrerer HPV-Typen in Zusammenhang gebracht werden (61). Die mittlere Infektionsdauer mit HPV-Typ 16 und 18 lag z.B. bei 11 bzw. 12 Monaten, bei Typ 6 und 39 jeweils bei 6 Monaten (61). Franco et al machten 1999 mit der Ludwig-McGill-Kohorte ähnliche Beobachtungen (62). So waren von den 177 Fällen, die bei Aufnahme in die Studie HPV-positiv waren, 6 Monate später noch 61% positiv und nach 12 Monaten nur noch 35% (62). Außerdem war die monatliche Clearance-Rate für nicht-onkogene HPV-Typen höher (12,2%), als für onkogene Typen (9,5%); somit war natürlich auch die mittlere Retentionsdauer für onkogene Typen mit 8,1 Monaten länger, als für nicht-onkogene Typen mit 4,8 Monaten (62). Die mittlere Infektionsdauer betrug 8,2 Monate (nicht-onkogene Typen) bzw. 13,5 Monate (onkogene Typen) (62). Kjaer et al kamen 2002 zu dem Resultat, dass bei HPV-positiven Frauen, die zytologisch normal waren, eine Clearance von 71% vorlag, welche bei den Frauen mit gering- bzw. hochgradigen Läsionen bei 40% bzw. 26% lag (60). Dalstein et al zeigten 2003, dass 50,6% der Frauen, die positiv für Hochrisiko-HPV-Typen getestet wurden, die virale Infektion im Mittel innerhalb von 7,5 Monaten beseitigen konnten, wobei die Clearance-Rate bei geringer Viruslast größer war (63).



### 2.1.4.1.3 HPV-Prävalenz

Eine 15 613 Frauen (13 Regionen in 11 Ländern) ohne zytologische Abnormalitäten umfassende Studie zeigte, dass sich die HPV-Prävalenz von Region zu Region unterscheidet (64). Stellvertretend für die einzelnen Kontinente stammten die Probandinnen aus folgenden Ländern: Nigeria repräsentierte Afrika (südlich der Sahara); Indien, zwei verschiedene Regionen Vietnams und Thailands, sowie Korea repräsentierten Asien; für Südamerika standen Kolumbien, Argentinien und Chile; für Europa die Niederlande, Italien und Spanien (64). Die höchste HPV-Prävalenz wurde mit 25,6% in Nigeria (Afrika) konstatiert, gefolgt von Südamerika mit 14,3%, Asien mit 8,7% und schließlich Europa mit 5,2% (64). Zusammengefasst liegt die weltweite HPV-Prävalenz damit bei 10,5% (64). Tabelle 1 gibt die länderbezogenen detaillierten Prävalenzen wieder.

	Number in age-group (years)							HPV prevalence				Age-standardised* prevalence for any HPV (95% CIs)
	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	Total	Single HPV	Multiple HPV		Number with any HPV(%)	
									2	≥3		
Sub-Saharan Africa												
Nigeria	113	174	125	172	151	91	826	16.5%	5%	3.3%	204 (24.7%)	25.6% (22.4-28.8)
Asia												
India	321	804	424	215	35	0	1799	11.5%	2.1%	0.4%	252 (14.0%)	14.2% (12.0-16.4)†
Vietnam, Ho Chi Minh	157	170	182	154	160	80	903	5.3%	2.0%	1.9%	83 (9.2%)	10.6% (0.7-2.4)
Thailand, Lampang	122	171	167	154	180	160	954	4.3%	1.2%	0.5%	57 (6.0%)	7.2% (5.3-9.2)
Korea	7	141	258	228	156	31	821	6.9%	0.9%	0.7%	70 (8.5%)	13.3% (4.7-21.9)
Thailand, Songkla	67	110	119	124	140	98	658	2.7%	0.5%	0.2%	22 (3.3%)	3.6% (1.9-5.4)
Vietnam, Hanoi	122	182	181	162	210	108	965	1.2%	0.2%	0.1%	15 (1.6%)	1.6% (0.7-2.4)
Sub-total Asia												8.7% (7.9-9.5)
South America												
Colombia	412	728	477	97	65	37	1816	10.4%	2.8%	1.4%	265 (14.6%)	13.9% (12.1-15.7)
Argentina	139	182	184	180	105	49	839	8.9%	3.3%	3.2%	130 (15.5%)	16.3% (13.7-18.9)
Chile	118	178	210	165	152	68	891	8%	2.2%	0.6%	96 (10.8%)	11.9% (9.6-14.3)
Sub-total South America												14.3% (13.1-15.5)
Europe												
Netherlands	26	432	994	1138	696	13	3299	3.4%	0.8%	0.3%	146 (4.4%)	7.7% (4.1-11.3)
Italy	0	219	224	225	228	101	997	6.9%	0.8%	0.1%	78 (7.8%)	9.2% (7.5-11.0)‡
Spain	150	144	161	142	140	108	845	1.0%	0.4%	0.0%	11 (1.3%)	1.4% (0.5-2.2)
Sub-total Europe												5.2% (4.2-6.2)
All areas	1754	3635	3706	3156	2418	944	15613	6.6%	1.7%	0.9%	1429 (9.2%)	10.5% (9.9-11.0)

\*Based on world standard population reported by Doll and colleagues.<sup>16</sup> †For women aged 15-64 years only. ‡For women aged 25-74 years only.

\*Based on world standard population reported by Doll and colleagues.<sup>16</sup> †For women aged 15-64 years only. ‡For women aged 25-74 years only.

*Tabelle 1 (64): Altersverteilung, roh-und altersstandardisierte HPV-Prävalenz der Frauen ohne zervikale Auffälligkeiten bei den von der Agentur für Krebsforschung („Agency for Research on Cancer“, IARC) durchgeführten Erhebungen, je nach Untersuchungsgebiet*

Abbildung 7 stellt in Form von Kreisdiagrammen dar, wie hoch der jeweilige prozentuale Anteil verschiedener HPV-Typen an der Gesamtzahl der betrachteten HPV-Infektionen in unterschiedlichen Regionen ist.

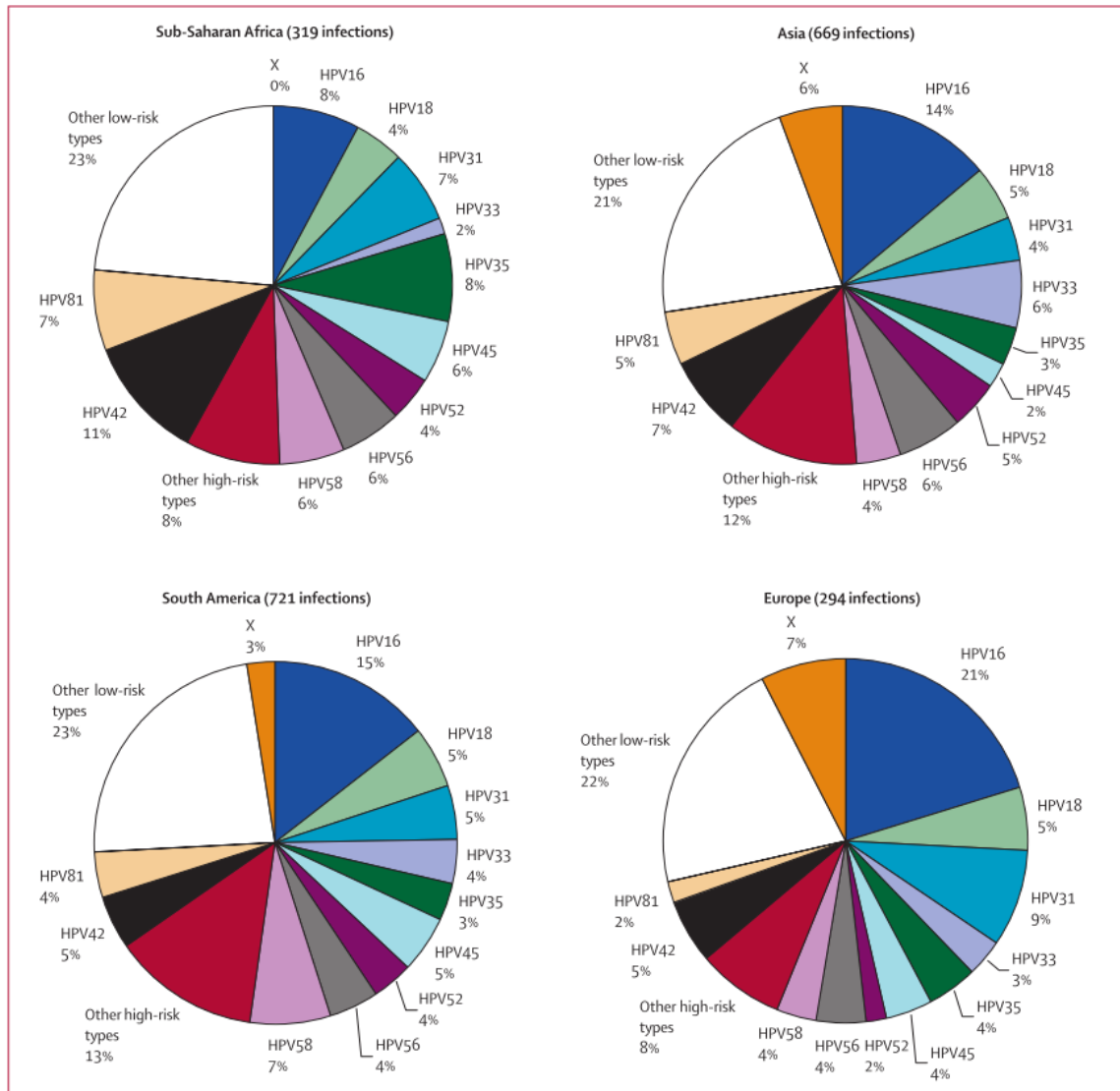


Abbildung 7 (64): Prozentualer Anteil unterschiedlicher HPV-Typen an der Gesamtzahl der betrachteten HPV-Infektionen in verschiedenen Regionen

In den USA wurden in den Jahren 2003 und 2004 2026 vaginale Abstrich-Proben von Frauen zwischen 14 und 59 Jahren gesammelt (65). Von den 1921 adäquaten Proben waren 26,8% HPV-positiv (65). Rechnet man das auf die Volkszählungsdaten aus dem Jahr 2000 hoch, sind 24,9 Millionen Frauen dieser Altersklasse HPV-positiv (65).

#### 2.1.4.1.4 Aufbau Humaner Papillomaviren (HPV)

Aktuelle Daten lassen darauf schließen, dass mehr als 200 HPV-Typen existieren (66). Bisher wurde das Genom von ungefähr 100 HPV-Typen isoliert und komplett sequenziert, wovon ungefähr 40 den anogenitalen Trakt infizieren (66-69). Humane Papillomaviren sind kleine, unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren, deren ringförmiges Genom aus circa 8000 Basenpaaren besteht und von einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von 50 nm umgeben wird (66, 70-72). Das Genom lässt sich in drei Regionen einteilen, die Kontrollregion, die frühe und die späte Region mit den frühen und den späten Genen, je nachdem wann sie während der Infektion exprimiert werden:

**- Kontroll-Region:** long control region (LCR), circa 1 kb

kodiert nicht für Proteine aber beinhaltet cis-Elemente, die die  
Replikation und Genexpression regulieren

**- Frühe Region:** early (E) region, circa 4 kb

mit den sechs frühen Genen (early genes) E1, E2, E4, E5, E6 und E7, die für Nicht-Struktur-Proteine kodieren

E1: kodiert für Proteine, die für die Instandhaltung des viralen Genoms und dessen  
Replikation notwendig sind

E2: kodiert für Proteine, die die Transkription regulieren

E4: die Funktion der Proteine, für die E4 kodiert ist noch nicht ganz klar, aber die  
Unterbrechung des Zytokeratin-Netzwerks spielt eine Rolle

E5: kodiert für Proteine, die den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor aktivieren und  
somit das Zellwachstum stimulieren und die die Expression von p21 hemmen

E6: kodiert für ein Onkoprotein auf dessen Rolle später eingegangen wird

E7: kodiert für ein Onkoprotein auf dessen Rolle später eingegangen wird

**- Späte Region:** late (L) region, circa 3 kb

mit den zwei späten Genen (late genes) L1 und L2, die für zwei Kapsid-Proteine kodieren

L1/L2: kodieren für die großen und kleinen Kapsid-Proteine des Virus

(67, 70, 73)

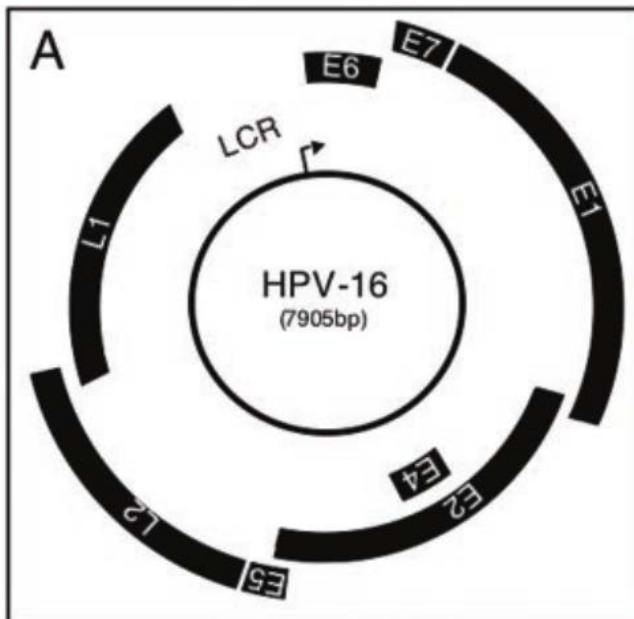


Abbildung 8 (70): Schematische Darstellung des Genoms des HPV-Typs 16 mit der LCR, den frühen (E1, E2, E4, E5, E6, E7) und den späten Genen (L1, L2)

#### 2.1.4.1.5 Nomenklatur Humaner Papillomaviren (HPV)

In der Mitte der 1950er und 1960er Jahre konnten Papillomaviren und Polyomaviren erstmals genau untersucht werden und wurden aufgrund ihres gemeinsamen Aufbaus (doppelsträngiges zirkuläres DNA-Genom, unbehüllt, ikosaedrisches Kapsid) als verwandt eingestuft und beide der Familie der Papovaviren zugeordnet (66). Allerdings stellte sich in den 1980er Jahren heraus, dass die Unterschiede (Genomgröße, Transkription, Aminosäuresequenz) zu groß waren, um sie einer gemeinsamen Familie zuzuordnen (66). Daher werden sie von dem Internationalen Komitee der Taxonomie der Viren (International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV) offiziell als zwei getrennte Familien, die der Papillomaviren (Papillomaviridae) und die der Polyomaviren (Polyomaviridae) anerkannt (71). Die Papillomaviren bilden somit ihre eigene Familie.

Abgekürzt werden Papillomaviren mit den beiden Buchstaben „PV“, welchen ein oder zwei Buchstaben vorangestellt werden, um den Wirt zu kennzeichnen (66). Das Vorangestellte kann zum einen aus dem Englischen stammen - so macht das „H“ bei HPV, das für „human“ steht, deutlich, dass der Wirt dieser Papillomaviren der Mensch ist - zum anderen kann es sich von der wissenschaftlichen Bezeichnung des Wirts ableiten - so steht z.B. „MnPV“ für

„Mastomys natalensis papillomavirus“, dem eine afrikanische Maus als Wirt dient (66). Die Typen der Humanen Papillomaviren werden in der Reihenfolge ihrer Beschreibung mit Nummern bezeichnet, z.B. HPV-1, HPV-2 usw. (74). Die Nummer wird erst vergeben, nachdem das gesamte Genom isoliert und charakterisiert wurde (71). Um zwischen HPV-Typen, deren Genom nicht durch konventionelles Klonen, sondern durch PCR-Amplifizierung generiert wurde, unterscheiden zu können, setzte man auf der Internationalen Papillomavirus Konferenz im Jahr 2000 fest, die Abkürzung „cand“ (für „candidate“) vor die Nummer zu setzen, z.B. candHPV-86 (66, 71). Humane Papillomaviren, deren Genom bisher nur teilweise durch PCR generiert wurde, bekommen noch keine Nummer, sondern eine Abkürzung, die für das betreffende Labor steht, zum Beispiel LVX100 für LouisaVillaX100 (66, 71). Anhand des Vergleichs des L1-Gens von 96 humanen Papillomaviren und 22 tierischen Papillomaviren, wurde folgende Klassifizierung etabliert: „genus“ (Gattung), „species“ (Spezies), „type“ (Typ), „subtype“ (Subtyp) und „variant“ (Variante) (71). Die Einteilung wird von Gattung bis zu Variante immer feiner (71). Die verschiedenen Gattungen haben weniger als 60% der Nukleotidsequenzen ihres L1-Gens gemeinsam, bei den unterschiedlichen Spezies innerhalb einer Gattung gleichen sich die Nukleotidsequenzen zu 60 bis 70%, bei den Typen innerhalb einer Spezies ist das zwischen 71 und 89% der Fall (71). Subtypen eines Typs unterscheiden sich in ihren Nukleotidsequenzen nur zu 2 bis 10% und Varianten nur zu 1 bis 2% (71). Momentan unterscheidet man bei Papillomaviren zwischen 16 Gattungen, die mit griechischen Buchstaben bezeichnet werden, einen Überblick verschafft Abbildung 9 (71).

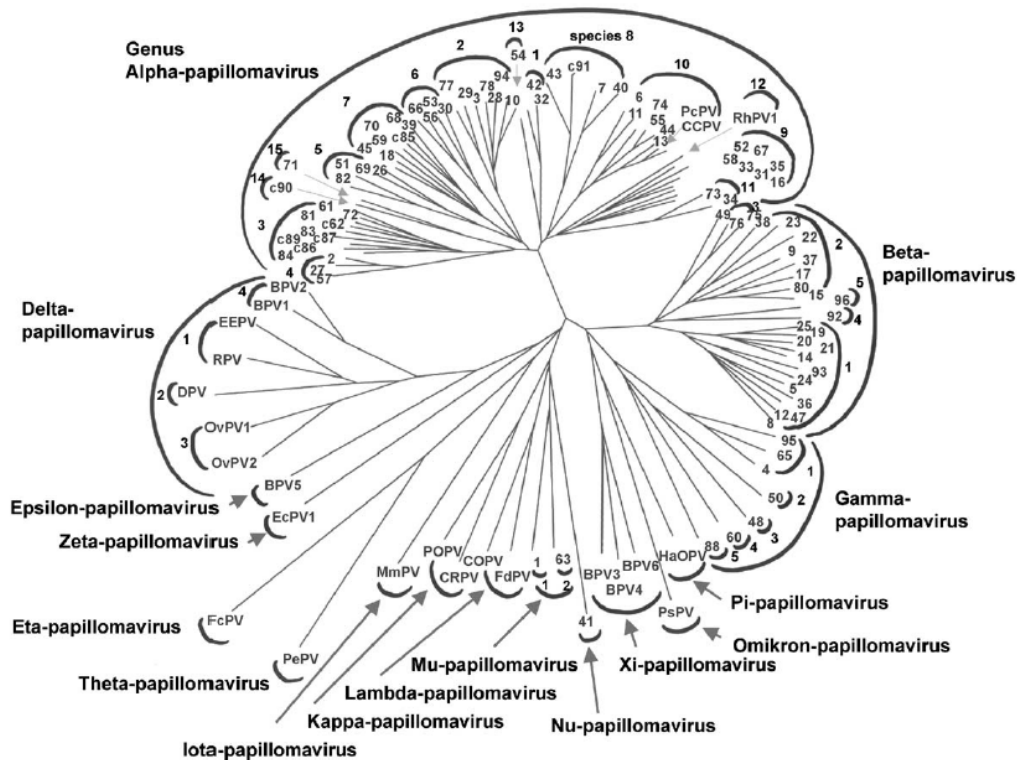


Abbildung 9 (71): Stammbaum der Papillomaviren

Von diesen 16 Gattungen sind allerdings nur 5, nämlich die Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-Gattung für den Menschen relevant, da nur sie den Menschen infizieren (72). Diese 5 Gattungen unterscheiden sich in ihrem Gewebetropismus; so infizieren Alpha-Papillomaviren Haut und Schleimhaut, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-Papillomaviren hingegen nur Haut (71). Somit kann man HP-Viren auch in mukosale und kutane Typen einteilen, je nach bevorzugtem Gewebe (67). Die beiden wichtigsten Gattungen sind die Alpha- und die Beta-Gattung, zu denen 90% der derzeit charakterisierten Humanen Papillomaviren gehören (72). Die der Beta-Gattung (infizieren nur Haut, keine Schleimhaut), verursachen gutartige Hautläsionen und bösartige Läsionen bei Patienten, die an EV (epidermodysplasia verruciformis) leiden und die immunsupprimiert sind (66, 72). Die Gattung der Alpha-Papillomaviren ist die größte der den Menschen betreffenden Gattungen und verursacht sowohl Haut-, als auch Schleimhautläsionen (71). Sie wird unterteilt in 15 Spezies, denen wiederum mehrere Typen zugeordnet werden, die verschiedene Auswirkungen auf den Wirt haben, so verursachen z.B. die HPV-Typen 2, 27 und 57 der Spezies 4 Hautwarzen (71). Diejenigen Typen, die den Genitaltrakt befallen, werden in niedrig-Risiko (low-risk) - Typen und in hoch-Risiko (high-risk) - Typen unterteilt (56). Die low-risk-Typen verursachen

genitale Warzen, wohingegen die high-risk-Typen zum Zervixkarzinom führen (56). Zu den 12 low-risk-Typen gehören die HPV-Typen 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108 (56). Von besonderer Bedeutung sind die 15 high-risk-Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, da sie zum Zervixkarzinom führen (56).

#### 2.1.4.1.6 Replikation Humaner Papillomaviren (HPV)

Aufgrund ihrer geringen Genomgröße kodieren Humane Papillomaviren selbst nicht alle Funktionen, die für ihre Replikation notwendig sind (7). Daher sind sie hierfür auf eine Wirtszelle angewiesen (7) und ihr Replikationszyklus steht somit in engem Zusammenhang mit der Differenzierung der befallenen Wirtszelle (70, 75). In normalem Plattenepithel sind die Basal- und Parabasalzellen die einzigen Zellen, die sich aktiv teilen (70, 76), daher müssen HPV-Viren Zugang zu diesen Zellen erlangen (72). Der Hauptübertragungsweg für die genitale HPV-Infektion ist Geschlechtsverkehr, sowohl vaginal, als auch anal, wobei Hautkontakt bestehen muss (8, 77). Durch Mikrotraumen beim Geschlechtsverkehr werden die basalen Zellen exponiert und somit zugänglich für die Viren (8, 34, 76, 78, 79). Die Tatsache, dass Mikrotraumen notwendig für eine Infektion mit HPV sind, konnte damit bewiesen werden, dass intaktes genitales Epithel von Mäusen nicht mit HPV infiziert wurde (80). Die Viren werden über die Bindung an Rezeptoren (Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptor,  $\alpha$ -Integrin-Rezeptor) in die Zelle eingeschleust (81-84). Nach der Infektion der Basalzellen (S-Phase kompetent) (85) wird dort das virale Genom 50 bis 100 Mal pro Zelle synchron mit der zellulären DNA repliziert (8, 72, 79, 86). Das virale Genom liegt im Zellkern extrachromosomal vor (86). Die frühen viralen Proteine werden auf niedrigem Level exprimiert (85). Wenn sich die infizierten Zellen teilen, wird die virale DNA auf beide Tochterzellen aufgeteilt (86). Eine der Tochterzellen wandert von der Basalschicht weg und beginnt sich zu differenzieren (86). Die andere Tochterzelle teilt sich weiterhin in der Basalschicht und stellt somit ein Reservoir viraler DNA dar, das sich weiterhin teilen kann (86). Da die Produktion der Humanen Papillomaviren auf die suprabasalen Zellschichten begrenzt ist und die basalen Zellschichten nicht durch die Virenproduktion lysiert werden, sondern sich weiterhin teilen, bleibt die Infektion bestehen (86). Sich differenzierende Zellen teilen sich nicht mehr und treten normalerweise, d.h. in nicht-infiziertem Epithel, aus dem Zellzyklus aus (85, 86). Das Austreten der sich differenzierenden Zelle aus dem Zellzyklus stellt ein Problem für das Virus dar, da es für seine Replikation auf DNA-Polymerasen und

Replikationsfaktoren der Wirtszelle angewiesen ist und diese nur in sich teilenden, nicht differenzierenden Zellen vorhanden sind (8). Das Virus muss sich aber in sich nicht mehr teilenden Zellen replizieren (8). Daher kommt es, wenn die infizierte Keratinozyte beginnt, sich zu differenzieren und damit den Zellzyklus verlässt, zu einer massiven Expression aller viralen Gene, auch E6 und E7 werden stark exprimiert, welche zu einer Dysregulation des Zellzyklus führen, wodurch die Amplifizierung des viralen Genoms in Zellen, die eigentlich den Zellzyklus verlassen haben, möglich wird (8, 79). Somit kodieren HP-Viren Funktionen, die in einer infizierten Zelle ein replikationsfähiges Milieu erhalten oder schaffen (70). Die virale DNA wird stark repliziert, sodass mindestens 1000 Kopien pro Zelle vorliegen (8). Zum Schluss werden auch die späten Proteine L1 und L2 exprimiert, die ein Kapsid um das neu-synthetisierte virale Genom bilden (79). Das Virus wandert zusammen mit der sich differenzierenden Keratinozyte von Kutis oder Mukosa durch die verschiedenen Epithelschichten, wobei zunächst die frühen Gene, später die späten Gene exprimiert werden (72, 85). In der obersten Epithelschicht angekommen, werden schließlich die neu-gebildeten Viren durch Abschuppung der Keratinozyten freigesetzt (8, 79). Wo genau E6-und E7-Onkoprotein angreifen wird im Folgenden erklärt.

## 2.1.4.2 Weitere Risikofaktoren

### 2.1.4.2.1 Sexualverhalten

Die genitale HPV-Infektion ist die häufigste sexuell übertragene Krankheit weltweit (87). Daraus kann man schließen, dass das Sexualverhalten der ausschlaggebende Risikofaktor ist. So konnte gezeigt werden, dass die HPV-Prävalenz mit abnehmendem Alter bei Aufnahme der sexuellen Aktivität zunimmt (65, 88-91). De González et al konnten in einer Metaanalyse einen Zusammenhang zwischen Alter bei Kohabitarche und Auftreten eines Plattenepithel- sowie Adenokarzinoms herstellen (92). Sie konnten demonstrieren, dass das Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken bei denjenigen Frauen, die ersten sexuellen Kontakt unter 17 Jahren haben, im Vergleich zu denjenigen, die mit über 20 Jahren ihre sexuelle Aktivität beginnen, um den Faktor 2,32 erhöht ist; hinsichtlich des Adenokarzinoms ist der Faktor 1,41 (92). Die Prävalenz erhöhende Faktoren sind außerdem die Anzahl der Geschlechtspartner und die Häufigkeit des Geschlechtsverkehrs: je größer die Anzahl der Partner und je häufiger der sexuelle Kontakt, desto größer die HPV-Prävalenz (65, 88-90).



#### 2.1.4.2.2 Orale Kontrazeptiva

Moreno et al konnten zeigen, dass bei HPV-positiven Patientinnen die Einnahmedauer oraler Kontrazeptiva einen Einfluss auf das Zervixkarzinom-Risiko hat (93). Bei einer Einnahme von weniger als 5 Jahren, war das Risiko im Vergleich zu dem von Frauen, die nie orale Kontrazeptiva nahmen, nicht erhöht, wohingegen es bei längerer Einnahme zunahm (93). So war das Risiko um den Faktor 4,03 bei Einnahme von 10 und mehr Jahren erhöht (93). Dieselben Ergebnisse erzielte eine Studie der WHO: das Risiko, am invasiven Plattenepithelkarzinom zu erkranken, steigerte sich signifikant mit der Dauer der Einnahme 4 bis 5 Jahre nach erstem Gebrauch und nahm nach Absetzen des Medikaments innerhalb von 8 Jahren auf das Risiko-Niveau ab, das ohne Einnahme besteht (94). Nach 97 und mehr Monaten Einnahme-Zeit war das Risiko um den Faktor 2,23 erhöht (94). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in Studien gezeigt werden konnte, dass die die Transkription regulierenden Regionen der HPV-DNA Hormon-Erkennungs-Elemente enthalten und dass in vitro die Transformation der Zellen mit viraler DNA durch Hormone verstärkt werden konnte (95-98).

#### 2.1.4.2.3 Rauchen

In einer großen Analyse, die die Daten von 23 veröffentlichten Studien zusammenfasst und der somit Daten von 13 541 Zervixkarzinom-Patientinnen und von 23 017 gesunden Frauen zugrunde liegen, konnte Tabak-Rauchen als Risikofaktor bestätigt werden (99). Frauen, die aktuell rauchen, haben im Vergleich zu Nicht-Raucherinnen, ein um den Faktor 1,46 signifikant erhöhtes Risiko am invasiven Plattenepithelkarzinom zu erkranken; auch das Risiko für das in situ-Karzinom ist erhöht (Faktor 1,83) (99). Selbst wenn das Rauchen schon eingestellt wurde, bleibt das Risiko erhöht; beim invasiven Karzinom nur geringfügig (Faktor 1,05), deutlicher beim in situ-Karzinom (Faktor 1,32) (99). Fasst man aktuelles Rauchen und bereits eingestelltes Rauchen zusammen und trennt nicht mehr zwischen invasivem Plattenepithelkarzinom und in situ-Karzinom, war das Risiko am Plattenepithelkarzinom zu erkranken um den Faktor 1,60 erhöht (99). Das Adenokarzinom betreffend ließen sich keine Zusammenhänge herstellen (99). Dabei spielt beim Plattenepithelkarzinom (invasives und in situ zusammengefasst) sowohl die Anzahl der konsumierten Zigaretten, als auch das Alter in dem mit dem Rauchen begonnen wurde, eine Rolle (99). Falls die Frauen aktuell rauchten, nahm die Wahrscheinlichkeit am

Plattenepithelkarzinom zu erkranken mit der Anzahl der Zigaretten zu: weniger als 5 Zigaretten/Tag: erhöht um den Faktor 1,18; 5-24 Zigaretten/Tag: erhöht um den Faktor 1,54; ab 15 Zigaretten/Tag: erhöht um den Faktor 1,98 (99). Bezüglich des Alters bei Rauch-Beginn ließ sich Folgendes feststellen: bei aktuell noch rauchenden Frauen war das relative Risiko für das Plattenepithelkarzinom umso höher, je früher mit dem Rauchen begonnen wurde: jünger als 16 Jahre: erhöht um den Faktor 2,00; zwischen 16 und 19 Jahren: erhöht um den Faktor 1,66; ab 20 Jahren: erhöht um den Faktor 1,35 (99). Auch hier konnte für das Adenokarzinom kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden (99). Winkelstein fasste 1990 die Ergebnisse von 15 epidemiologischen Studien von 1984-1989 zusammen und kam zu dem Ergebnis, dass 4 davon keinen Zusammenhang zwischen Rauchen und Zervixkarzinom sahen, wohingegen 11 eine Beziehung zwischen Beidem herstellen konnten (100). Kapeu et al konnten ebenfalls in 2 Studien zeigen, dass das Risiko am invasiven Zervixkarzinom zu erkranken bei Raucherinnen erhöht ist (101). Studie 1 umfasste 171 invasive Zervixkarzinom-Fälle und 496 Kontrollen, Studie 2 beinhaltete wesentlich mehr Fälle, nämlich 588 Zervixkarzinom-Fälle und 2861 Kontrollen (101). Als Maß für die Tabak-Exposition wurde das Cotinin-Level in Nanogramm (ng) pro Milliliter (mL) Serum herangezogen (101). Bei Studie 1 zeigte sich, dass das Risiko am invasiven Zervixkarzinom zu erkranken bei einem Cotinin-Level von  $\geq 100$  ng/mL um den Faktor 1,7 erhöht ist, bei Studie 2 um den Faktor 2,5 (101). Rauchen als Risikofaktor konnte in einer weiteren großen Studie bestätigt werden. Sie wurde von Plummer et al 2003 durchgeführt und beinhaltete nur HPV-positive Fälle (102). Es konnte verdeutlicht werden, dass das Risiko für das Zervixkarzinom (invasives und in situ-Karzinom zusammengefasst) von Frauen, die jemals geraucht haben, im Vergleich zu Frauen, die nie geraucht haben, um das 2,17 fache erhöht ist (102). Betrachtet man Plattenepithel- und Adenokarzinom getrennt, ist das Risiko für aktuelle Raucherinnen am Plattenepithelkarzinom zu erkranken um das 2,30 fache, für ehemalige Raucherinnen um das 1,80 fache höher als das von Frauen, die nie geraucht haben, wohingegen beim Adenokarzinom kein klarer Zusammenhang ersichtlich war (102). Dass die Wahrscheinlichkeit, eine CIN II-III zu entwickeln, für HPV-positive Raucherinnen höher ist, als bei ebenfalls HPV-positiven ehemaligen Raucherinnen, sowie bei Frauen, die niemals geraucht haben und mit der Anzahl der Jahre, in denen geraucht wurde, sowie der Menge der konsumierten Zigaretten zunimmt, konnte von Kjellberg et al gezeigt werden (103).

#### 2.1.4.2.4 Schwangerschaft

Schwangerschaften erhöhen bei HPV-positiven Frauen das Risiko am Plattenepithelkarzinom (invasives und in situ-Karzinom zusammengefasst) zu erkranken (104). Es nimmt mit der Anzahl der Schwangerschaften im Vergleich zu Frauen, die nie schwanger waren, signifikant zu und liegt bei Frauen, die 7 und mehr volle Schwangerschaften hatten, 3,82 mal so hoch (104). Für das Adenokarzinom ließ sich dieser Zusammenhang nicht herstellen (104). Für die Assoziation der Anzahl der Schwangerschaften mit zervikalen Neoplasien werden hormonelle, traumatische und immunologische Einflüsse als Erklärung herangezogen (105).

So zeigten Autier et al 1996, dass die Anzahl der Geburten die Lage der Transformationszone beeinflusst: die Wahrscheinlichkeit, dass sie in dem durch Kolposkopie einsehbaren Bereich auf der Ektozervix liegt, nimmt mit der Anzahl der Geburten zu und liegt bei  $\geq 5$  Geburten um das 3,3 fache höher als bei Frauen, die nie ein Kind geboren haben (106). Mögliche Ursachen dafür sind mechanische Effekte bei der Geburt und/oder hormonelle Veränderungen während der Schwangerschaft (106). Durch die Lage auf der Ektozervix ist die Transformationszone externen transformierenden Agenzien länger ausgesetzt (106). Eine andere Ursache für das erhöhte Risiko durch Schwangerschaft ist die reduzierte humorale Immunantwort gegen HPV-Infektion während der Schwangerschaft (107).

#### 2.1.4.2.5 Sexuell übertragene Infektionen

Die Tatsache, dass bei HIV-positiven Frauen persistierende Infektionen mit Humanen Papillomaviren vom Hoch-Risiko-Typ häufiger anzutreffen sind, als bei HIV-negativen Frauen, lässt darauf schließen, dass die HIV-assozierte Immunsuppression die Anfälligkeit der Frauen für eine Infektion mit HPV erhöht, oder den Verlauf einer bereits bestehenden HPV-Infektion verändert (108). Die Ergebnisse von La Ruche et al 1998 bestätigen diesen Zusammenhang: Frauen, die sowohl mit HIV, als auch mit HPV infiziert waren, hatten ein viel größeres Risiko für Präkanzerosen des Plattenepithels (SIL, squamous intraepithelial lesion) als Frauen, die entweder mit HPV oder mit HIV infiziert waren (109). Da die HIV-Infektion mit einer Immunsuppression verbunden ist, unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung des Wirtsimmunsystems bei der Kanzerogenese (105). Die Infektion mit dem Bakterium *Chlamydia trachomatis* wurde ebenfalls als Risikofaktor eingeordnet (110).

Serotyp G erhöhte das Plattenepithelkarzinom-Risiko am stärksten der untersuchten Serotypen von Chlamydia trachomatis, nämlich um den Faktor 6,6; es folgt Serotyp B (Faktor 4,1), Serotyp I (Faktor 3,8) und Serotyp H (Faktor 3,6) (110).

#### 2.1.4.2.6 Bildungsniveau

Der Bildungsgrad kann ebenfalls als Maß für das Risiko, am Zervixkarzinom zu erkranken, herangezogen werden: je niedriger das Bildungsniveau ist, desto häufiger treten CIN I, CIN II und CIN III auf (111) und desto höher ist die Prävalenz für eine Infektion mit HPV (65, 112).

#### 2.1.5 Bedeutung der Transformationszone (TZ) bei der Kanzerogenese

Der Großteil der Zervixkarzinome entsteht in der Transformationszone (34, 48, 113). Die Ursache dafür ist, dass dort Metaplasie stattfindet: das Plattenepithel der Ektozervix ersetzt das Zylinderepithel der Endozervix (4, 34). Regionen, in denen Metaplasie auftritt, sind Prädispositionsstellen für die Entstehung von Karzinomen (34, 114). Außerdem sind in der Transformationszone Basalzellen leicht für Humane Papillomaviren, die der entscheidende Faktor bei der Kanzerogenese sind, zugänglich (115). Jedoch lässt die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der HPV-Infizierten ein Zervixkarzinom entwickelt und der lange Zeitraum zwischen Erstinfektion mit HPV und Auftreten des Karzinoms, sowie das gehäufte Vorkommen von Zervixkarzinomen bei Aids-Patientinnen darauf schließen, dass es Kofaktoren geben muss, die vor allem immunologischer Natur sind (116). Tatsächlich wurde in der Transformationszone im Vergleich zur Ektozervix ein höheres Vorkommen der immunsupprimierenden Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 und eine geringere Dichte der Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen nachgewiesen (115, 116).

### 2.1.5.1 Verschiebung der Transformationszone (TZ)

Die Transformationszone verschiebt sich im Leben einer Frau (4). Grundsätzlich verschiebt sie sich mit zunehmendem Alter Richtung Endozervix: So liegt sie bei Frauen unter 25 Jahren zu 94% exozervikal, was bei Frauen, die älter als 64 Jahre alt sind, nur bei 2% der Fälle zutrifft (106). Betrachtet man die Lageveränderung zu verschiedenen Lebensphasen der Frau genauer, so ist Folgendes festzuhalten: Beim Fötus liegt in Folge der mütterlichen Hormone, die zu einer vermehrten Proliferation von Zylinderepithel führen, Ektopie (Ausdehnung des endozervikalen Zylinderepithels auf die Exozervix) (117) vor, wohingegen die Transformationszone beim Kind wegen des Fehlens der mütterlichen Hormone und der noch fehlenden eigenen Östrogene endozervikal liegt (47). Mit zunehmendem Alter befindet sie sich immer häufiger auf der Exozervix: bei 9-11 Jährigen ist dies bei 10% der Fall, bei 21 bis 23 Jährigen dagegen bei 90% (47). Ursächlich dafür ist, dass der Corpus uteri unter Einfluss der mit der Pubertät einsetzenden hormonellen Umstellung wächst, wegen der anatomischen Gegebenheiten kann dies nur nach unten und außen stattfinden, was dazu führt, dass vorher endozervikales Zylinderepithel nun auf der Exozervix liegt (47). Außerdem kommt es während der ersten Periode zu einem Absinken des vaginalen pH-Wertes, was Metaplasie induziert (47). Die hormonelle Situation während der Schwangerschaft führt durch Hyperplasie des Zylinderepithels zu einer Verschiebung von endozervikalem Epithel auf die Exozervix (47). In der Menopause verschiebt sich die Transformationszone wieder nach endozervikal (47). Allerdings führen nicht nur Hormone zu Metaplasie, sondern auch sexuelle Aktivität; so ist bei sexuell aktiven Frauen im Vergleich zu sexuell inaktiven mehr Metaplasie zu beobachten (47). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das männliche Ejakulat mit seinem niedrigen pH-Wert immunsuppressiv wirkt, wodurch sexuell übertragbare Krankheiten voran schreiten können (47). Interessant ist auch, dass die Tatsache, ob eine Frau Kinder geboren hat, einen Einfluss auf die Lage der Transformationszone hat: so ist sie bei 29% der 45 Jährigen, die kein Kind auf die Welt gebracht haben, auf der Exozervix lokalisiert, was bei 71% der 45 Jährigen mit 4 oder mehr Kindern der Fall ist (106). Dies wird zum einen durch den mechanischen Effekt erklärt, den Geburten auf die Zervix haben, zum anderen durch die hormonelle Veränderungen während der Schwangerschaft (106).

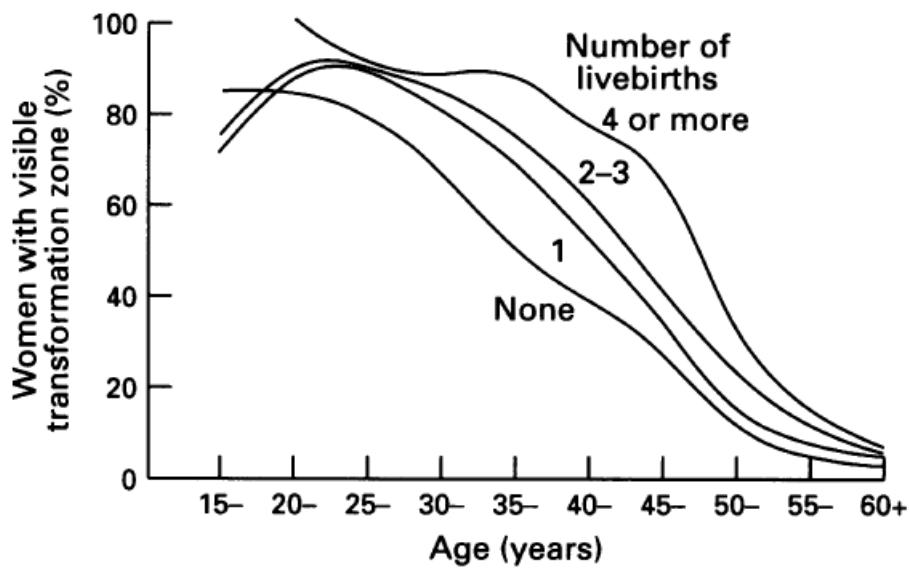


Abbildung 10 (106): Sichtbarkeit der Transformationszone  
(women with visible transformation zone) in Abhängigkeit von Alter (Age) und Anzahl der Geburten (Number of livebirths)

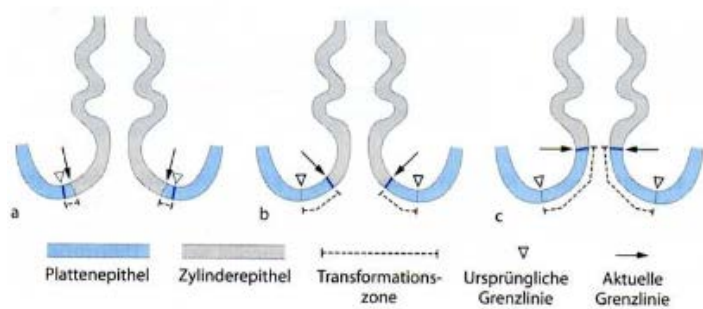


Abbildung 11 (118) S.330: Altersabhängige Lokalisation der Transformationszone  
a) in der Pubertät b) beim Einsetzen der Geschlechtsreife c) postmenopausal

## 2.1.6 Klassifikation der Dysplasien der Zervix

### 2.1.6.1 Präkanzerosen der Zervix

#### 2.1.6.1.1 Präkanzerosen des Plattenepithels:

Zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

(squamous intraepithelial lesion (SIL))

Unter dem Begriff zervikale intraepitheliale Neoplasie versteht man zahlreiche Atypien des Plattenepithels der Zervix, die mit einem gesteigerten Risiko für die spätere Entwicklung eines Carcinoma in situ einhergehen (119). Die Läsionen werden bezogen auf das Ausmaß der Differenzierung in 3 Grade eingeteilt (119):

CIN I: leichte Dysplasie, höchstes Maß der Differenzierung

CIN II: mittelschwere Dysplasie, weniger differenziert

CIN III: schwere Dysplasie und Carcinoma in situ, geringstes Maß der Differenzierung  
(119-121)

Allen 3 Dysplasie-Graden gemeinsam ist ihr abnormales Epithel, in dem Zellorganisation und Zellreifung gestört sind und sowohl die Kerne, als auch das Zytoplasma von der Norm abweichen (121). Die histologischen Kennzeichen einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie sind Kernanomalien, Veränderungen die Zellreifung betreffend und das Vorliegen von mitotischer Aktivität (122, 123).

Kernanomalien: auftretende Kernatypien sind Vergrößerung, verstärkte Anfärbbarkeit, Chromatin-Verklumpung und Unregelmäßigkeiten in Größe und Form (124, 125). Verantwortlich dafür wird in erster Linie die aneuploide Chromosomenzahl gemacht, die bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien nachgewiesen werden konnte (124, 126, 127). Der Grad der Kernanomalien steht oft mit dem Maß der Differenzierung in Zusammenhang, d.h. je ausgeprägter die Kernanomalien sind, desto weniger Differenzierung liegt vor (124, 125).

Zellreifung/Differenzierung: bei der Zervix werden Zellreifung und Differenzierung häufig gleichbedeutend verwendet (123, 124). Wenn Plattenepithelzellen reifen, nimmt das Kern-zu-Zytoplasma-Verhältnis zur Epitheloberfläche hin ab, somit ist in den Zellen, die näher an der Oberfläche liegen, das Zytoplasma das dominierende Kompartiment (123). Bei der Klassifizierung der CIN ist entscheidend, wie groß der Anteil des differenzierten Epithels am Gesamtepithel ist (124, 125).

Mitotische Aktivität: Im normalen Plattenepithel der Zervix liegt nur eine geringe mitotische Aktivität vor, die vor allem in den parabasalen-und basalen Zellschichten stattfindet (128). Es konnte gezeigt werden, dass die Mitosefrequenz mit zunehmendem Grad der Dysplasie ansteigt (129). Tabelle 2 fasst die histologischen Kennzeichen zusammen.

---

1. Differentiation (maturation, stratification)
(a) Present or absent
(b) Proportion of epithelium showing differentiation
2. Nuclear abnormalities
(a) Nucleus: cytoplasm ratio
(b) Hyperchromasia
(c) Nuclear pleomorphism and anisokaryosis
3. Mitotic activity
(a) Number of mitotic figures
(b) Height in epithelium
(c) Abnormal configurations

---

*Tabelle 2 (124) S. 270: Histologische Kennzeichen der CIN*

Mit Bezug auf die genannten allgemeinen Kriterien, weisen die verschiedenen Grade der zervikalen intraepithelialen Neoplasien folgende histologische Kennzeichen auf:

Die geringste histologische Veränderung, die vorhanden sein muss, um CIN I diagnostizieren zu können, ist das Auftreten von Kernanomalien (geringer Grad von nukleärem Pleomorphismus, Anstieg der Kern-zu-Plasma-Relation, Vergrößerung des Kerns, verstärkte Anfärbbarkeit) im gesamten Epithel (130). Die Kernanomalien sind gering und vor allem im basalen Drittel (124, 125). Zellreifung liegt in den oberen zwei Dritteln des Epithels vor (120, 123-125, 131). Mitosefiguren sind vorhanden, jedoch in geringer Zahl und auf das basale Epitheldrittel begrenzt, abnormale Mitosefiguren sind selten (124, 125).

Auch bei CIN II werden im gesamten Epithel Kernatypien nachgewiesen, die jedoch massiver sind als bei CIN I und sich nicht mehr nur in erster Linie im basalen Drittel befinden (123-125). Zellreifung ist nur noch in der oberen Epithelhälfte vorhanden (124, 125). Mitosefiguren finden sich in den unteren zwei Dritteln des Epithels und sind nicht selten abnormal (120, 124, 125).

Im CIN III-Stadium finden sich wieder im gesamten Epithel Kernatypien (125), deren Ausmaß ist jedoch stärker als bei CIN I und II (123). Zellreifung ist entweder überhaupt nicht mehr vorhanden oder auf das obere Drittel begrenzt (124, 125). Mitosefiguren können zahlreich vorhanden sein und verteilen sich über das gesamte Epithel, wobei abnormale



Formen häufig sind (124, 125). Dass die Zahl der Mitosen mit steigendem CIN-Grad zunimmt, konnten Van Leeuwen et al. zeigen; so stieg der Mitose-Index von 3 bei CIN I über 4 bei CIN II zu 9 bei CIN III an (132). Außerdem konnten sie nachweisen, dass die Zahl der normalen Mitose-Figuren mit zunehmendem Grad der CIN signifikant abnahm, wohingegen abnormale Mitosefiguren mit zunehmendem CIN-Grad signifikant häufiger anzutreffen waren (132). Pathologen können oft nur schwer zwischen CIN I und CIN II unterscheiden, weswegen empfohlen wird, die zervikalen intraepithelialen Neoplasien nicht mehr in drei Kategorien einzuordnen, sondern nur noch zwischen einem niedrigen (momentan CIN I und CIN II) und einem hohen Grad der Dysplasie (momentan CIN II) zu differenzieren (119, 133, 134).

#### 2.1.6.1.2 Präkanzerosen des Drüsenepithels:

Zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie (CGIN)  
(cervical glandular intraepithelial Neoplasia (CGIN))

Die WHO teilt Präkanzerosen des Drüsenepithels in endozervikale glanduläre Dysplasien (endocervical glandular dysplasia, EGD) und in Adenokarzinom in situ (adenocarcinoma in situ, AIS) ein (135, 136). Im United Kingdom wird hingegen eine andere Terminologie verwendet: zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie (cervical glandular intraepithelial neoplasia, CGIN) (135, 136). Man unterscheidet zwischen einem niedrigen (low grade CGIN, LCGIN) und einem hohen Grad der Dysplasie (high grade CGIN, HCGIN) (135-137). Dabei entsprechen HCGIN und LCGIN AIS und EGD (135). CGIN kommen viel seltener vor als CIN (138). Histologische Kennzeichen:

Beim Vorliegen einer CGIN sind sowohl Veränderungen in den oberflächlicheren Epithelschichten, als auch in den tieferen Schichten zu beobachten und der Übergang zwischen normalem und atypischem Zylinderepithel ist immer abrupt (135, 138). Die CGIN stellt sich zum einen durch strukturelle, zum anderen durch zytologische Merkmale dar (136-138).

Strukturelle Merkmale: die Drüsen stehen enger zusammen, sind verzweigter, bilden Knospen und haben ein siebähnliches Muster (136).

Zytologische Merkmale: Kernvergrößerung, verstärkte Anfärbbarkeit, erhöhte Mitoserate, manchmal abnormale Mitosen, wenig oder kein zytoplasmatisches Muzin mehr und erhöhte Kern-zu-Zytoplasma-Rate (135, 136, 138).

## 2.1.6.2 Maligne Tumore der Zervix

Fast drei Viertel aller Zervixkarzinome sind Plattenepithelkarzinome (139). Adenokarzinome und adenosquamöse Karzinome machen 10-15% aus, ebenso wie Zervixkarzinome mit anderer oder ohne spezifische Histologie (139). Tabelle 3 gibt einen Überblick über die histologische Klassifikation aller Tumore der Zervix laut WHO.

<b>Epithelial tumours</b>		<b>Neuroendocrine tumours</b>	
<b>Squamous tumours and precursors</b>		Carcinoid	8240/3
Squamous cell carcinoma, not otherwise specified	8070/3	Atypical carcinoid	8249/3
Keratinizing	8071/3	Small cell carcinoma	8041/3
Non-keratinizing	8072/3	Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Basaloid	8083/3	Undifferentiated carcinoma	8020/3
Verrucous	8051/3		
Warty	8051/3	<b>Mesenchymal tumours and tumour-like conditions</b>	
Papillary	8052/3	Leiomyosarcoma	8890/3
Lymphoepithelioma-like	8082/3	Endometrioid stromal sarcoma, low grade	8931/3
Squamotransitional	8120/3	Undifferentiated endocervical sarcoma	8905/3
Early invasive (microinvasive) squamous cell carcinoma	8076/3	Sarcoma botryoides	8910/3
Squamous intraepithelial neoplasia		Alveolar soft part sarcoma	9581/3
Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3 /	8077/2	Angiosarcoma	9120/3
squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3
Benign squamous cell lesions		Leiomyoma	8890/0
Condyloma acuminatum		Genital rhabdomyoma	8905/0
Squamous papilloma	8052/0	Postoperative spindle cell nodule	
Fibroepithelial polyp			
<b>Glandular tumours and precursors</b>		<b>Mixed epithelial and mesenchymal tumours</b>	
Adenocarcinoma	8140/3	Carcinosarcoma (malignant müllerian mixed tumour; metaplastic carcinoma)	8980/3
Mucinous adenocarcinoma	8480/3	Adenosarcoma	8933/3
Endocervical	8482/3	Wilms tumour	8960/3
Intestinal	8144/3	Adenofibroma	9013/0
Signet-ring cell	8490/3	Adenomyoma	8932/0
Minimal deviation	8480/3		
Villoglandular	8262/3	<b>Melanocytic tumours</b>	
Endometrioid adenocarcinoma	8380/3	Malignant melanoma	8720/3
Clear cell adenocarcinoma	8310/3	Blue naevus	8780/0
Serous adenocarcinoma	8441/3		
Mesonephric adenocarcinoma	9110/3	<b>Miscellaneous tumours</b>	
Early invasive adenocarcinoma	8140/3	Tumours of germ cell type	
Adenocarcinoma in situ	8140/2	Yolk sac tumour	9071/3
Glandular dysplasia		Dermoid cyst	9084/0
Benign glandular lesions		Mature cystic teratoma	9080/0
Müllerian papilloma			
Endocervical polyp		<b>Lymphoid and haematopoietic tumours</b>	
<b>Other epithelial tumours</b>		Malignant lymphoma (specify type)	
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Leukaemia (specify type)	
Glassy cell carcinoma variant	8015/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3	<b>Secondary tumours</b>	
Adenoid basal carcinoma	8098/3		

<sup>1</sup> Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (921) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /2 for in situ carcinomas and grade 3 intraepithelial neoplasia, /3 for malignant tumours, and /1 for borderline or uncertain behaviour.

<sup>2</sup> Intraepithelial neoplasia does not have a generic code in ICD-O. ICD-O codes are only available for lesions categorized as squamous intraepithelial neoplasia grade 3 (e.g. cervical intraepithelial neoplasia 3) = 8077/2, squamous cell carcinoma in situ = 8070/2, glandular intraepithelial neoplasia grade 3 = 8148/2 and adenocarcinoma in situ = 8140/2.

Tabelle 3 (140) S. 260: Histologische Klassifikation der Tumore der Cervix uteri nach der WHO

### 2.1.6.2.1 Plattenepithelkarzinom

Ein Plattenepithelkarzinom ist definiert als ein invasives Karzinom, das aus Plattenepithelzellen mit verschiedenen Graden der Differenzierung besteht (140). Die WHO unterscheidet folgende Typen des Plattenepithelkarzinoms: verhornt, nicht verhornt, basaloid, verrukös, kondylomatös, papillär, lymphoepitheliomartig und „squamotransitional“ (140). Am häufigsten sind die verhornte und die nicht verhornte Form (141).

Histologische Kennzeichen:

Verhornte Plattenepithelkarzinome sind durch gut differenzierte Plattenepithelzellen charakterisiert, die in Nestern oder schnurartig angeordnet sind und große Unterschiede hinsichtlich Größe und Anordnung aufweisen (142). Außerdem sind Hornperlen zu erkennen, schon eine einzige ist ausreichend um ein Karzinom als verhornt zu bezeichnen (142). Die Perlen bestehen aus Gruppierungen von Plattenepithelzellen, die einen Verhornungsprozess durchlaufen haben und sind in konzentrischen Nestern angeordnet (142). Die neoplastischen Plattenepithelzellen, die keine Hornperlen bilden, haben häufig viel eosinophiles Zytoplasma und auffällige Interzellulärbrücken (142). Die Zellkerne sind oft vergrößert, aber Mitosefiguren sind eher selten (142). Unverhornte Plattenepithelzellen sind gekennzeichnet durch Nester aus neoplastischen Plattenepithelzellen, die häufig einzelne Verhornungsprozesse durchlaufen, aber keine Hornperlen bilden (142). Die Zellgrenzen sind relativ unklar (142). Die Zellkerne sind rund bis oval und weisen verklumptes Chromatin auf (142). Mitosefiguren sind häufig zu erkennen (142).

Grading:

Man unterscheidet zwischen gut differenziert (Grad 1), mäßig differenziert (Grad 2) und schlecht differenziert (Grad 3) (142). Die meisten Plattenepithelkarzinome werden Grad 2 zugeordnet, gefolgt von Grad 3 und Grad 1 (142).

### 2.1.6.2.2 Adenokarzinom

Ein Adenokarzinom weist eine drüsenartige Differenzierung auf (140). Beim Adenokarzinom werden laut WHO folgende Arten unterschieden: muzinöses, endometrioides, klarzelliges, seröses und mesonephrisches Adenokarzinom (140). Am häufigsten sind das muzinöse Adenokarzinom (57%), danach folgen die endometrioiden (30%) und die klarzellige Form (4%), sowie die anderen Subtypen (141). Beim muzinösen Adenokarzinom enthalten mindestens einige der Zellen eine mäßige bis große Menge intrazytoplasmatisches Muzin, es können folgende Untergruppen gebildet werden: Endozervikales und intestinales Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinom, Minimal-Deviation-Adenokarzinom und villoglanduläres Karzinom (140). Das endozervikale Adenokarzinom ist die häufigste Form (136). Histologische Kennzeichen:

endozervikale Adenokarzinome bestehen aus Zellen mit basal gelegenen Zellkernen und Muzin-haltigem Zytoplasma (142). Sie sind gut bis mäßig differenziert und sind in komplexen, drüsenartigen Mustern angeordnet, die die tunnelartige Konfiguration der normalen endozervikalen Mukosa nachahmen (142). Die Zellen sind typischerweise geschichtet und erhebliche Kernatypien (Kerngrößenvariationen, grob verklumptes Chromatin, markante Nukleoli) sind möglich (142). Üblicherweise sind Mitosen häufig und große Mengen von Muzin, das Seen oder Teiche bildet, können im Stroma gefunden werden (142). In weniger differenzierten Tumoren enthalten die Zellen weniger Zytoplasma aber zeigen normalerweise immer noch drüsige Strukturen (142).

## 2.1.7 Kanzerogenese

### 2.1.7.1 Karzinomentwicklung über Vorstufen

Zervixkarzinome entwickeln sich aus Vorstufen (143, 144). Die prämaligen Veränderungen reichen von CIN I (leichte Dysplasie) über CIN II (mittelschwere Dysplasie) bis zu CIN III (schwere Dysplasie) (144, 145). Am Ende dieser mehrschrittigen Pathogenese, die bis zu 20 Jahre dauern kann, steht das invasive Karzinom (95, 146). Es ist aber bei weitem nicht so, dass sich zwangsläufig jede CIN I zu einer CIN II entwickelt, aus der wiederum eine CIN III wird und am Ende schließlich das invasive Karzinom steht. Östör fasste 1993 die bis dahin vorhandene Literatur ab 1950 bezüglich Regression, Persistenz und Progression der zervikalen intraepithelialen Neoplasien zusammen und kam zu folgendem Ergebnis: bei einer CIN I liegt die Regressionsrate bei 60%, die Persistenzrate bei 30%, die Progressionsrate zu CIN III bei 10% und die Progressionsrate zum invasiven Karzinom bei 1% (147). Bezüglich einer CIN II ist die Verteilung folgendermaßen: Regression: 40%, Persistenz 40%, Progression zu CIN III: 20%, Progression zum invasiven Karzinom: 5% (147). Die Wahrscheinlichkeit der Regression einer CIN III liegt bei 32% und die der Progression zum invasiven Karzinom ist höher als 12% (147).

	Regression	Persistenz	Progression zum in situ Karzinom	Progression zum invasiven Karzinom
CIN I	57%	32%	11%	1%
CIN II	43%	35%	22%	5%
CIN III	32%	56%	-	12%

*Tabelle 4 modifiziert nach (147): Natürlicher Verlauf einer CIN, Zusammenfassung*

### 3. Fragestellung

Humane Papillomaviren können aufgrund ihrer geringen Genomgröße nicht alle Funktionen, die für ihre Replikation notwendig sind, selbst kodieren (7) und sind somit zur Replikation auf eine Wirtszelle angewiesen (7). Die Viren gelangen durch Mikrotraumen, die beim Geschlechtsverkehr entstehen, in die Wirtszelle (8, 34, 76, 78). Wenn die infizierte Keratinozyte beginnt, sich zu differenzieren, werden alle viralen Gene stark exprimiert, auch E6 und E7 (8). Das E6-Onkoprotein kann an p53 binden (9, 10) und stimuliert dadurch den Abbau von p53 durch das Ubiquitin-abhängige Proteasesystem (11). Die Bindung von E6 an p53 wird durch einen zellulären Kofaktor, E6-AP (E6-associated protein, E6-assoziertes Protein) vermittelt (148, 149). E6 bindet an E6-AP, der entstehende Komplex dient als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (150, 151). p53 ist ein Tumorsuppressor (12), d.h. im Fall von DNA-Schäden oder anderen Arten von Stress wie Hitzeschock oder Hypoxie ist p53 dafür verantwortlich, entweder das Voranschreiten des Zellzyklus zu unterbrechen, indem es zu einem Zell-Zyklus-Arrest in der G1-Phase führt (13, 14), DNA-Reparatur-Mechanismen zu aktivieren (15), oder die Apoptose, den programmierten Zelltod, einzuleiten (12, 16, 17). Unter normalen Bedingungen wird p53 eng durch MDM2, das an p53 bindet und als Ubiquitin-Protein-Ligase agiert, über eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife kontrolliert (12, 16, 18). Das E7-Onkoprotein führt zum Abbau von pRB über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (19). Das Retinoblastomprotein (pRb) ist ebenfalls ein Tumorsuppressor-Protein (20-23). Durch die Inaktivierung von pRb durch E7 kommt es zu einer Überexpression von p16 (25, 26). Daher dient der immunhistochemische Nachweis von p16 als Marker für HPV-assozierte dysplastische und maligne zervikale Läsionen (27, 28). Galektin-3 ist u.a. an der Tumormetastasierung beteiligt, indem es die Angiogenese induziert, an  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Integrin bindet und deren Expression hochreguliert (29-31). Außerdem beeinflusst Galektin-3 die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort: Galektin-3 induziert die T-Zell-Apoptose und schränkt die T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion durch Bildung von Komplexen mit auf dem T-Zell-Rezeptor vorhandenen Glykanen ein (29, 32, 33).

Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von E6-Onkoprotein, p53, einer mutierten Form von p53, p16, MDM2 und Galektin-3 beim Zervixkarzinom zu untersuchen. Dies geschah mittels Immunhistochemie.

Ursprünglich sollte das E7-Onkoprotein ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Allerdings musste darauf letztendlich verzichtet werden, da zwar ein immunhistochemisches Färbeprotokoll für den E7-Antikörper der Firma Chemicon (Nr. MAB 8680, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erarbeitet werden konnte, welches zu spezifischen Färbeergebnissen führte, aber die Produktion des betreffenden Antikörpers eingestellt wurde und kein adäquater Ersatz gefunden werden konnte. Alle anderen getesteten E7-Antikörper führten zu inakzeptablen Färbeergebnissen.

## 4. Patientenkollektiv, Material und Methoden

### 4.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 250 Patientinnen, allerdings konnten nur 248 der 250 Tumorgewebe analysiert werden. Die Gewebeproben wurden im Rahmen des aufgrund eines Zervixkarzinoms an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführten operativen Eingriffes gewonnen. Die Patientinnen dieses Kollektivs unterzogen sich der Operation in den Jahren 1993 bis 2002. Die pathologische Bewertung erfolgte durch das histopathologische Labor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Campus Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Tabelle 5 gibt Auskunft über die klinischen Daten der Patientinnen.

	<b>Anzahl/Gesamtzahl</b>	<b>%</b>
<b>Alter bei Diagnosestellung/Jahre</b>		
≤50	143/248	58
>50	105/248	42
<b>Anzahl positiver Lymphknoten</b>		
0	149/248	60
1-4	97/248	39
NV	2/248	1
<b>Tumorgröße / cm</b>		
<2	111/248	45
2-4	128/248	52
>4	9/248	3
<b>Tumorgrading</b>		
I	20/248	8
II	141/248	57
III	78/248	31
NV	9/248	4
<b>Tumor-Subtyp</b>		
Plattenepithelkarzinom	199/248	80
Adenokarzinom	49/248	20
<b>Progression</b> (nach 236 Monaten)		
keine	190/248	77
mindestens eine	58/248	23
<b>Überleben</b> (nach 236 Monaten)		
am Leben	210/248	85
tot	38/248	15

*Tabelle 5: klinische Merkmale des Patientenkollektivs; NV: nicht verfügbar*



## 4.2 Materialien

### 4.2.1 Geräte

- Brutschrank: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- Dampf-Kochtopf vitafit®: Fissler GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland
- Färbeautomat: Ventana BenchMark XT: Roche, Mannheim, Germany
- Inkubationskästen: Eigenproduktion der ehemalige Klinikwerkstatt
- Kamera: 3 CCD KY-F55B, JVC: JVCKENWOOD Deutschland GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
- Kochplatte: THL 2597: Rommelsbacher ElektroHausgeräte GmbH, Dinkelsbühl, Deutschland
- Kühlschrank: Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
- Küvetten und Färbegestelle: Küvetten: Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland  
Färbegestelle: DURAN Productions GmbH & Co.KG, Mainz, Deutschland
- Mikroskop: Leitz Diaplan: Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Schlittenmikrotom: Hn40, Reichert-Jung: Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Vortex-Schüttler: Vortex Genie 2<sup>TM</sup>, Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
- Waage: Kern S72: Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
- Wasserbad: Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
- Zentrifuge: minispin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

#### 4.2.2 Verbrauchsmaterialien

- Aqua dest.: Friedrich Noll, Destilliertes Wasser für alle Zwecke, München, Deutschland
- Citronensäure: 0,1 M, Merck#244: Merck 1.00244.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Deckgläser: Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- Detektionssysteme: VECTASTAIN Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA  
VECTASTAIN Elite ABC Kit Mouse IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA  
ZytoChem-Plus HRP Polymer- Kit, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
- Ethanol: 50%: Apotheke Innenstadt Uni-München, München, Deutschland  
70%: CLN GmbH Chemikalien, Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland  
96%: CLN GmbH Chemikalien, Laborbedarf, Niederhummel, Deutschland  
99%: SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
- Eindeckmittel: Eukitt ®: O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%: AnalaR NORMAPUR®, VWR International GmbH, West Chester Pennsylvania, USA
- Methanol: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Na-Citrat: 0,1 M, Merck#6448: Merck 1.06448.100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Objektträger: Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
- PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
- saures Hämaalaun nach Mayer: Haemalaun-Lösung sauer nach Mayer, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
- Substrat-Chromogen-System: Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System, Dako North America, Carpinteria, CA, USA
- Tween ®: Tween ® 20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Xylol: Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

#### 4.2.2.1 Anzusetzende Lösungen

- DAB gebrauchsfertig: 1 Tropfen DAB-Chromogen pro ml Substrat-Puffer

- 3% iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol: 3ml 30% iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 97ml Methanol

- Na-Citratpuffer (pH 6,0):

Gebrauchslösung: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B + 900ml Aqua dest.

Lösung A: 21,01g 0,1 M Citronensäure (Merck #244) + 1l Aqua dest.

Lösung B: 29,41g 0,1 M Na-Citrat (Merck #6448) + 1l Aqua dest.

- PBS als Waschmedium:

Gebrauchslösung: 500ml des 10fach-Konzentrats + 4500ml Aqua dest.

10fach-Konzentrat: 450g NaCl + 71,65g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 13,35g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 500ml Aqua dest.,

pH= 7,4

- Sekundärantikörper: Goat Anti-Mouse IgM: Biotin, polyclonal ( $\mu$ -chain specific),

Konzentration: 0,5 mg/ml, Firma: Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim,

Deutschland, Bestellnummer: ZMB 2020, Verdünnung: 1:100 in PBS

### 4.2.3 Primärantikörper

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Anti-HPV 16 E6+ HPV 18 E6 antibody	C1P5 Mouse IgG1 monoklonal	1,000 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK	ab70
Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Galectin-3	9C4 Mouse IgG1 monoklonal	4,6 mg/ml	Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK	NCL-GAL3
Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody MDM2 Protein	1B10 Mouse IgM	unbekannt	Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK	NCL-MDM2
Anti-Mutant p53 antibody	Y5 Rabbit IgG monoklonal	0,092 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK	ab32049
Anti-p53 antibody	PAb240 Mouse IgG1 kappa monoklonal	1,000 mg/ml	Abcam, Cambridge, UK	ab26
CINtec® p16 Histology	E6H4™ Mouse IgG <sub>2a</sub> monoklonal	1,0 µg/ml	Roche, Mannheim, Germany	06695230001

*Tabelle 6 : verwendete Primärantikörper*

Alle Antikörper außer Anti p16 wurden per Hand gefärbt. Die Anti-p16-Färbung erfolgte vollautomatisiert mit dem Färbeautomaten Ventana BenchMark XT am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die genauen Abläufe der manuellen Färbungen für die jeweiligen Antikörper werden im Folgenden erklärt.

## 4.3. Methoden

### 4.3.1 Immunhistochemie

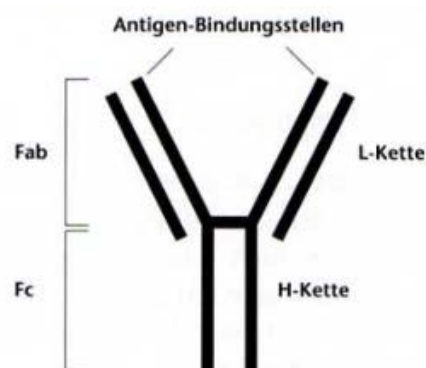
#### 4.3.1.1 Definition Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie versteht man ein Verfahren, bei dem Proteine mit spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, sowie einem Detektionssystem markiert werden (152, 153). Dadurch wird im Lichtmikroskop sichtbar, ob und wo in dem begutachteten Gewebe das gesuchte Protein existiert (153). Zu Beginn konnte mit den damals vorhandenen Antikörpern nur frisches Material gefärbt werden, da die aktuell industriell hergestellten Antikörper paraffingängig sind, können diese in der Routinediagnostik angewendet werden (153).

#### 4.3.1.2 Definition Antikörper

Antikörper sind Abwehrstoffe, die von B-Lymphozyten und Plasmazellen als Reaktion auf das Eindringen von Antigenen gebildet werden (154). Sie sind Eiweißkörper, die zur Fraktion der Immunglobuline gezählt werden und können eine spezifische Bindung mit einem Antigen bilden (154). Unterschieden werden die Immunglobulinklassen IgG, M, A, D und E (154). Die am häufigsten zur Diagnostik verwendeten Antikörper sind IgG-Antikörper (154). Das IgG-Molekül setzt sich aus zwei langen und zwei kurzen Polypeptidketten zusammen, die über Disulfidbrücken verbunden sind (154). Die langen Ketten werden auch als H-Ketten (heavy), die kurzen Ketten als L-Ketten (light) bezeichnet (154). Außerdem spricht man von den Fab-Stücken („ab“ steht für antigenbindend), an deren Enden die für das jeweilige Antigen spezifischen Antigen-Bindungsstellen liegen und von dem Fc-Stücke („c“ steht für constant) (154).

*Abbildung 12 (154) S.1:  
Schematische Darstellung  
eines IgG-Moleküls*



#### 4.3.1.3 Vorbereitung des immunhistochemisch zu färbenden Gewebes

Gewebe, das aus dem Körper im Rahmen der Tumorresektion entfernt wurde, muss unverzüglich fixiert werden, weil es sonst durch körpereigene Fermente autolysiert werden würde (155). Durch die Fixation erreicht man den Stillstand der Enzymaktivität (155). Zur Fixierung dient 4% iges neutral gepuffertes Formalin (155). Nach der Fixation wird das Gewebe eingebettet, was in einem Automaten stattfindet (155). Dabei wird es mit einem zunächst flüssigen Stoff, der später zu einer festen Masse wird, z.B. Paraffin, getränkt (155). Das Paraffin lagert sich dort an, wo Wasser ist, welches im Zuge des Einbettens entfernt wird (155). Das mit Paraffin getränkte Gewebe wird anschließend mit flüssigem Paraffin zu einem Block gegossen (155). Der erkaltete Block wird vor dem Schneiden im Gefrierfach gekühlt (155). Mit dem Schlittenmikrotom werden dann 2-3 µm dünne Gewebsschnitte vom Block abgetragen (155). Die Schnitte werden in einem Wasserbad (ca.40 °C) gestreckt und auf für Immunhistochemie beschichtete (positive Ladung erzielt bessere Haftung der Schnitte) Objektträger aufgezogen (155). Um eine gute Haftung der Schnitte zu erzielen, werden die Objektträger nach dem Aufziehen über Nacht bei 56-58 °C im Brutschrank gelagert (155).

#### 4.3.1.4 Prinzipieller Ablauf einer immunhistochemischen Färbung

Eine immunhistochemische Färbung beruht darauf, dass ein Primärantikörper an ein Antigen bindet, was dann durch verschiedene Detektionsverfahren ersichtlich gemacht wird (155).

**1. Vorbehandlung:** Zum Herauslösen des Paraffins aus dem Gewebe dient Xylol, welches dann in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus unterschiedlich konzentrierten Ethanol, entfernt wird (155). Zwischen den absoluten Alkoholen werden durch 3% iges  $H_2O_2$  in Methanol die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen inaktiviert (155). Das ist notwendig, weil sie zu unspezifisch positiven Ergebnissen führen können (155). Nachdem die Schnitte die absteigende Alkoholreihe durchlaufen haben, werden sie zur Entfernung von Ethanolresten in Aqua dest. geschwenkt (155). Nun erfolgt die Antigendemaskierung, die notwendig ist, um bestimmte Antigene darstellen zu können (155). Die Demaskierung ermöglicht es Antikörpern, vorher durch Aldehydvernetzung (Fixierung) maskierte Epitope zu erkennen (155). Die Antigendemaskierung erfolgt z.B. durch Hitzevorbehandlung (155). Durch das Kochen der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung (Citratpuffer) wird

die durch die Fixierung mit Formalin entstandene Proteinvernetzung wieder gelöst (155). Eine andere Methode zur Antigendemaskierung ist die proteolytische Vorbehandlung mit Enzymen wie Protease, Trypsin und Proteinase K (155).

Jetzt findet die eigentliche Färbung statt (155). Die Färbung wird in feuchten Kammern durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern (155). Die Färbeprotokolle unterscheiden sich je nach Primärantikörper (155).

**2. Blockierung der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers:** Um eine unspezifische Anfärbung zu verhindern, sättigen Blockiermedien elektrostatische Ladung im Gewebe ab und wirken damit der unspezifischen, hydrophoben Bindung von Immunglobulinen an Membranen und Fettgewebe entgegen (155). Als Blockiermedien dienen z.B. die Blockierseren aus den Detektionskits (155).

**3. Inkubation des Primärantikörpers:** Welche Inkubationszeit für den betreffenden Antikörper am besten ist, wird getestet (155). Gängige Zeiten liegen bei 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 16 bis 18 Stunden über Nacht bei 4 °C (155). Es gibt monoklonale und polyklonale Antikörper (155).

**4. Detektion des gebundenen Primärantikörpers:** für die Färbungen wurden zwei Verfahren verwendet, um den an das Antigen gebundenen Primärantikörper zu detektieren (155).

a) ABC-Methode: (Strept) Avidin-Biotin-Complex-Methode (156)

Die Avidin-Biotin-Methode oder besser gesagt die Streptavidin-Biotin-Methode beruht auf der starken Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin, um Komplexe aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörpern zu bilden (154-156). Das Glykoprotein Avidin hat 4 Bindungsstellen für Biotin (154, 155). Das ursprünglich verwendete Avidin wurde aus Hühnereiweiß gewonnen und führte zum Teil zu unspezifischen Ergebnissen (154, 155). Daher wurde es durch das gentechnisch hergestellte, reinere Streptavidin ersetzt (154, 155). Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das sich gut an den Sekundär-Antikörper/Brückenantikörper ankoppeln lässt und dadurch die Verbindung

zum ABC-Komplex bildet (154, 155). Als Brückenantikörper werden oft Multi-Link-Antikörper verwendet (154, 155).

Der Ablauf der ABC-Methode ist wie folgt:

1. der Primärantikörper bindet an das Antigen (157)
2. der biotinylierte (mit Biotin markierte) Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper (157)
3. Reaktion zwischen dem Enzym-markierten (Strept) Avidin-Biotin-Komplex und dem biotinylierten Sekundärantikörper (157)

Der Komplex wird so hergestellt, dass an drei der vier Bindungsstellen des Avidins ein Biotin-Molekül gebunden wird (154, 155). Das an den Komplex gekoppelte Enzym ist Peroxidase oder alkalische Phosphatase (154). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Peroxidase verwendet (155). Indem man Substrat/Chromogen hinzugibt, startet man eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase (155). Im Verlauf der Reaktion kommt es an Bindungsstellen des Primärantikörpers zur Bildung eines Farbniederschlags, der im Lichtmikroskop zu erkennen ist (155).

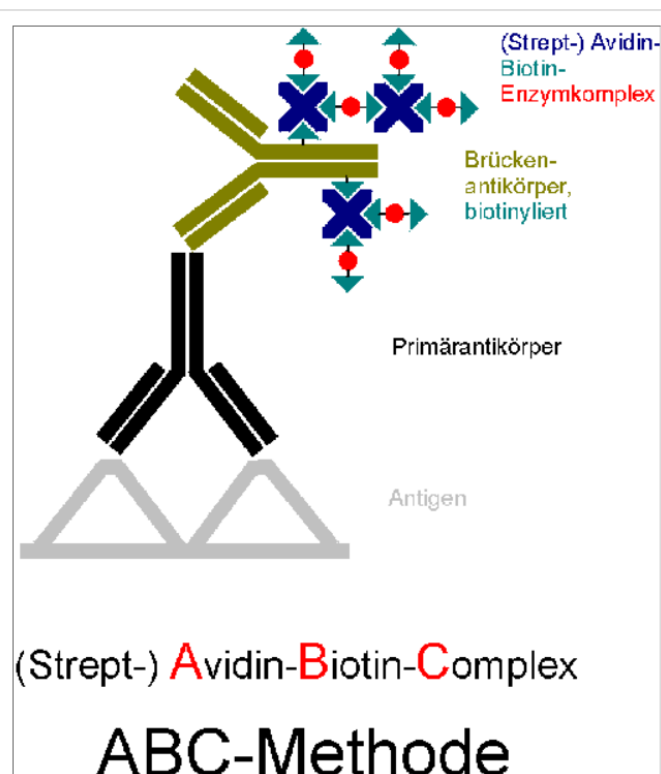


Abbildung 13 (156): Schematische Darstellung der ABC-Methode



b) Zytochem-Plus HRP Polymer-Methode: HRP: Horse Radish Peroxidase (155, 158)

Die ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kits haben gegenüber den auf dem Streptavidin-Biotin-Prinzip beruhenden Nachweistechiken den Vorteil, dass sie die durch endogenes Biotin im Präparat hervorgerufene Hintergrundfärbung umgehen (158). Es wird ein Enzym-Polymer verwendet, in dem mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP) kovalent verknüpft sind (158). Das Kit umfasst 3 Reagenzien: BlockingSolution (zur Verringerung der durch unspezifische Bindung von Primärantikörper oder Sekundärantikörper im HRP-Polymer verursachten Hintergrundfärbung), PostBlock (Verstärkungsreagenz) und HRP-Polymer (155). Nach der Vorbehandlung der Schnitte wird die BlockingSolution aufgetragen, dann der Primärantikörper (155). Nach dem Waschen der Schnitte erfolgt die Inkubation mit dem PostBlock und nach einem weiteren Waschvorgang die Inkubation mit dem HRP-Polymer (155). Nachdem das überschüssige HRP-Polymer abgewaschen wurde, erfolgt die Zugabe der Substrat/Chromogenlösung, wodurch eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase beginnt, in deren Verlauf dort, wo der Primärantikörper gebunden hat, ein Farbniederschlag entsteht, den man im Lichtmikroskop erkennen kann (155).

**5.Chromogen:** Als Chromogen wird DAB (3,3 Diaminobenzidin) verwendet, das ein braunes Farbprodukt ergibt (155).

**6. Gegenfärbung:** Die Gegenfärbung wird mit saurem Hämalun nach Mayer durchgeführt (155). Darunter versteht man einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung mit einem pH-Wert von ca. 4,5 (155). Die Kerne werden stärker blau gefärbt als das Plasma (155). Das Säureresteentfernen und das Bläuen finden in Leitungswasser statt (155).

**7. Dehydrierung und Eindecken:** Die Schnitte werden nach dem Bläuen in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylol aufgehellt (155). Als letzter Schritt werden die Präparate mit dem hydrophoben Eindeckmedium „Eukitt“ eingedeckt (155).

**8. Kontrollen:** Als Positivkontrolle dient Gewebe, das das Antigen sicher enthält (155). Indem man die Positivkontrolle den Färbedurchgang zusammen mit allen anderen Präparaten durchlaufen lässt, kontrolliert man den Färbedurchgang auf Fehlerlosigkeit (155). Isotypenkontrollen sind Negativkontrollen, die Aussagen über das Hintergrundsignal des Primärantikörpers treffen lassen, d.h. ob eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers vorliegt (159). Als Isotypenkontrollen dienen Antikörper gegen ein Antigen, das nicht in den untersuchten Zellen auftritt (159). Am besten entsprechen die Isotypenkontrollen den Arten, der schweren Kette, der Unterklasse und der leichten Kette des Primärantikörpers (159). Zu einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers kommt es z.B. durch unspezifische Fc-Rezeptorbindung an Zellen, unspezifische Antikörperinteraktionen mit zellulären Proteinen oder Autofluoreszenz der Zellen (159).

#### 4.3.1.5 Spezielle Abläufe der immunhistochemischen Färbungen mit den verwendeten Primärantikörpern p53, p53 mutiert, E6, MDM2, Galektin-3 und p16

Die Schnitte wurden für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert und danach in 99% igem Ethanol geschwenkt. Anschließend erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase, indem die Schnitte für 20 Minuten in 3% igem  $H_2O_2$  in Methanol verblieben. Dann wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe bestehend aus 99% igem, 70% igem und 50% igem Ethanol sowie Aqua dest. rehydriert. Nun erfolgte für die Antikörper p53, mutierte Form von p53, E6 und MDM2 die Antigendemaskierung durch Hitzevorbehandlung. Dazu wurden die Schnitte für 5 Minuten in einem Na-Citratpuffer (pH 6,0) gekocht. Nach dem Kochen wurden sie in Aqua dest. gespült. Für Galektin-3 entfiel das Kochen, die Schnitte verblieben in Aqua dest. Der weitere Ablauf für p53, mutierte Form von p53 und E6 ist in Tabelle 7 zu sehen. Verwendetes Detektionssystem: ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit.

<b>p53</b>	<b>p53 mutiert</b>	<b>E6</b>
Waschen 2x2 min in PBS/0,05% Tween	Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Blocking Solution (Reagent 1) 5 min.	Blocking Solution (Reagent 1) 5 min.	Blocking Solution (Reagent 1) 5 min.
Abkippen der Blocking Solution	Abkippen der Blocking Solution	Abkippen der Blocking Solution
Inkubation mit Primär- Antikörper 1:200 in PBS 16h/4°C	Inkubation mit Primär- Antikörper 1:100 in PBS 16h/4°C	Inkubation mit Primär- Antikörper 1:150 in PBS 1h/Raumtemperatur
Waschen 2x2 min in PBS/0,05% Tween	Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Post Block (Reagent 2) 20 min	Post Block (Reagent 2) 20 min	Post Block (Reagent 2) 20 min
Waschen 2x2 min in PBS/0,05% Tween	Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
HRP-Polymer (Reagent 3) 30 min	HRP-Polymer (Reagent 3) 30 min	HRP-Polymer (Reagent 3) 30 min
Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Substratfärbung mit DAB (gebrauchsfertig) 1 min	Substratfärbung mit DAB (gebrauchsfertig) 1 min	Substratfärbung mit DAB (gebrauchsfertig) 1 min

*Tabelle 7: Färbeprotokoll für die Primärantikörper p53, mutierte Form von p53 und E6*

Nach der Substratfärbung wurden die Schnitte zum Stoppen der Farbreaktion 2x2 min in Aqua dest. gewaschen. Dann erfolgte die Gegenfärbung für 2 min in saurem Hämalaun nach Mayer, das Bläuen in Leitungswasser (5 min), die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 99%) bis Xylol und das luftdichte Eindecken mit „Eukitt“. Den weiteren Färbevorgang für den Primärantikörper MDM2 nach dem Kochen und für den Primärantikörper Galektin-3 stellt Tabelle 8 dar.

Verwendetes Detektionssystem für MDM: Goat- anti-Mouse IgM biotinyliert (Firma Linaris)  
in Kombination mit Blockierserum und ABC-  
Reagenz aus Vectastain Elite ABC Kit,Rabbit IgG

Verwendetes Detektionssystem für Galektin-3: Vectastain Elite ABC Kit, Mouse IgG

<b>MDM2</b>	<b>Galektin-3</b>
Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Blockierserum 3 Tropfen Goat-Normalserum auf 10 ml steriles PBS 20 min	Blockierserum 3 Tropfen Horse-Normalserum auf 10 ml steriles PBS 20 min
Abkippen des Blockierserums	Abkippen des Blockierserums
Inkubation mit Primärantikörper 1:100 in PBS 16h/4°C	Inkubation mit Primärantikörper 1:1000 in PBS 16h/4°C
Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Sekundärantikörper: Goat-Anti-Mouse IgM biotinyliert: 1:100 in PBS  30 min	Sekundärantikörper: 3 Tropfen Normalserum+ 1 Tropfen Anti-Mouse IgG+ 10 ml steriles PBS 30 min
Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A+ 4 Tropfen Reagenz B+ 10 ml steriles PBS (muss 30 min vor Gebrauch angesetzt sein) 30 min	ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A+ 4 Tropfen Reagenz B+ 10 ml steriles PBS (muss 30 min vor Gebrauch angesetzt sein) 30 min
Waschen 2x2 min in PBS	Waschen 2x2 min in PBS
Substratfärbung mit DAB (gebrauchsfertig) 1 min	Substratfärbung mit DAB (gebrauchsfertig) 5 min

*Tabelle 8 : Färbeprotokoll für die Primärantikörper MDM2 und Galektin-3*

Nach der Substratfärbung wurden die Schnitte zum Stoppen der Farbreaktion 2x2 min in Aqua dest. gewaschen. Dann erfolgte die Gegenfärbung für 2 min in saurem Hämalaun nach Mayer, das Bläuen in Leitungswasser (5 min), die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 99%) bis Xylol und das luftdichte Eindecken mit „Eukitt“.

p16 wurde nicht wie alle anderen Antikörper manuell, sondern maschinell gefärbt. Die Färbung erfolgte durch den Färbeautomaten Ventana BenchMark XT der Firma Roche im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

#### 4.3.1.6 Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für den jeweiligen Antikörper kamen folgende Gewebe zur Anwendung:

- p53: Colon mit Metastase aus einem Ovarial-Karzinom
- mutierte Form von p53: Mamma-Karzinom
- E6: CIN III Konus
- MDM2: Vulva
- Galektin-3: Colon
- p16: high grade CIN

#### 4.3.1.7 Auswertung mittels IRS Score

Die Schnitte wurden mit dem IRS Score (immunreaktiver Score) nach Remmele und Stegner unter dem Mikroskop ausgewertet. Dabei beurteilt man die Farbintensität und die Anzahl der positiven Tumorzellen und vergibt entsprechende Werte (160, 161). Die Farbintensität wird mit den Werten 0-3 bewertet, die Anzahl positiver Tumorzellen mit den Werten 0-4 (160, 161). Die Multiplikation des für Farbintensität vergebenen Wertes mit dem für die Anzahl positiver Tumorzellen vergebenen Wertes ergibt den IRS Score (160, 161). Tabelle 9 erklärt, wie die Werte vergeben werden.

<b>Färbeintensität</b>	<b>Anteil positiver Tumorzellen</b>	<b>max. Wert</b>
<b>0</b> = keine Färbereaktion	<b>0</b> = keine positiven Zellen	<b>3 x 4 = 12</b>
<b>1</b> = schwache Färbereaktion	<b>1</b> = < 10% positive Zellen	
<b>2</b> = mäßige Färbereaktion	<b>2</b> = 10 - 50% positive Zellen	
<b>3</b> = starke Färbereaktion	<b>3</b> = 51 - 80% positive Zellen	
	<b>4</b> = > 80% positive Zellen	

*Tabelle 9 (160): Schema der Wertevergabe für Farbintensität und Anteil positiver Tumorzellen bei dem IRS Score*

Beispiel für die Berechnung des IRS Scores: Der Schnitt wurde folgendermaßen bewertet:

Farbintensität: schwach, Anteil positiver Tumorzellen: 10-50%. Somit wird die Farbintensität mit 1 bewertet, der Anteil positiver Tumorzellen mit 2. Die Multiplikation dieser beiden Zahlen ergibt 2. Der IRS Score für diesen Schnitt ist somit 2.

#### 4.3.1.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit der SPSS Statistik Software (Version 19, IBM, Armonk, New York) für MS Windows.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expression von E6

Insgesamt zeigten 81% der Zervixkarzinom-Fälle eine Expression des E6-Onkoproteins.

#### 5.1.1 E6 und T-Status

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem T-Status und dem IRS Score für das Zytoplasma und somit mit der E6-Expression: Je höher der T-Status, desto höher der IRS Score, desto stärker also die E6-Expression. Als T1 bewertete Karzinome wiesen einen mittleren IRS von 2 auf ( $p=0,017$ ) (Abbildung 14a). T2-(Abbildung 14b) und T3-Karzinome (Abbildung 14c) zeigten einen mittleren IRS von 3 ( $p=0,017$ ). Eine Zusammenfassung der Färberegebnisse in Zusammenhang mit dem T-Status zeigt Abbildung 14d in Form eines Boxplot-Diagramms.

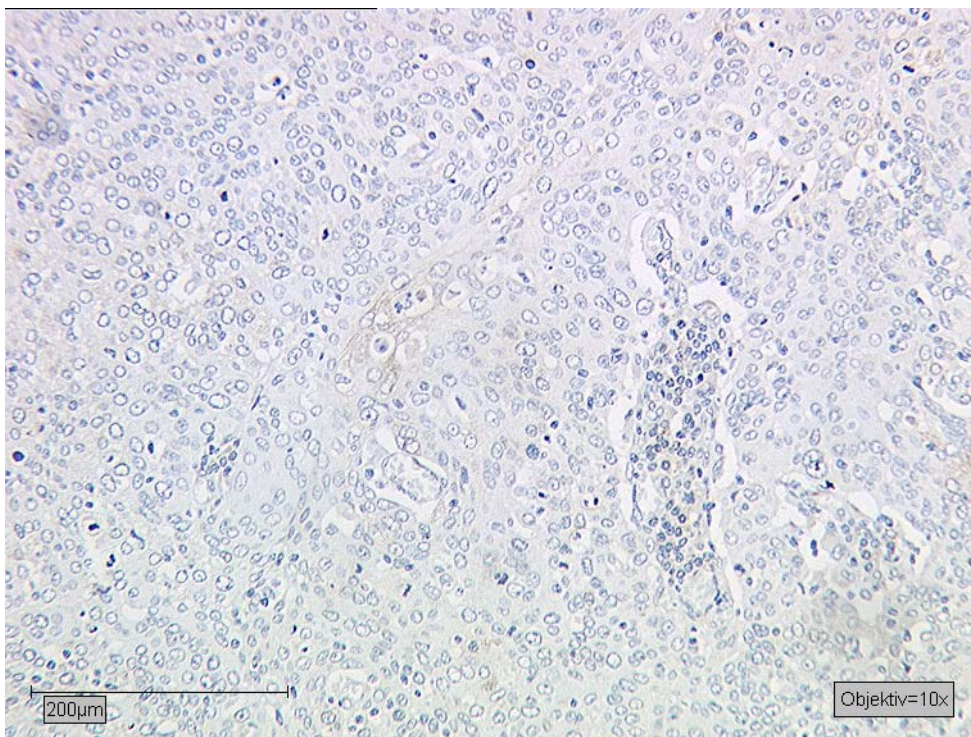
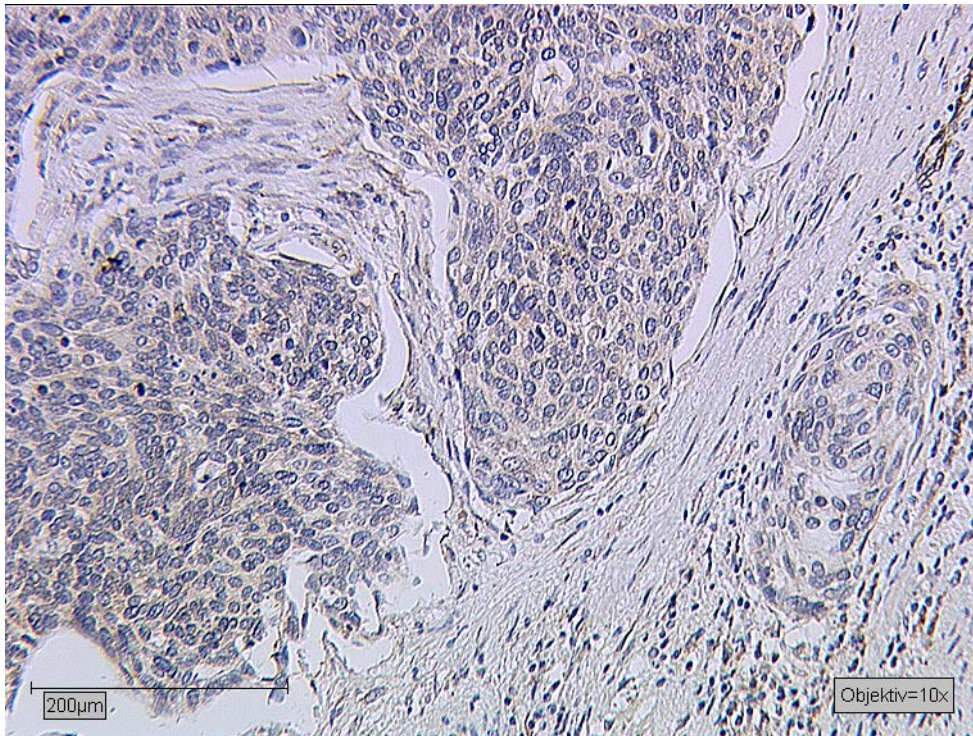
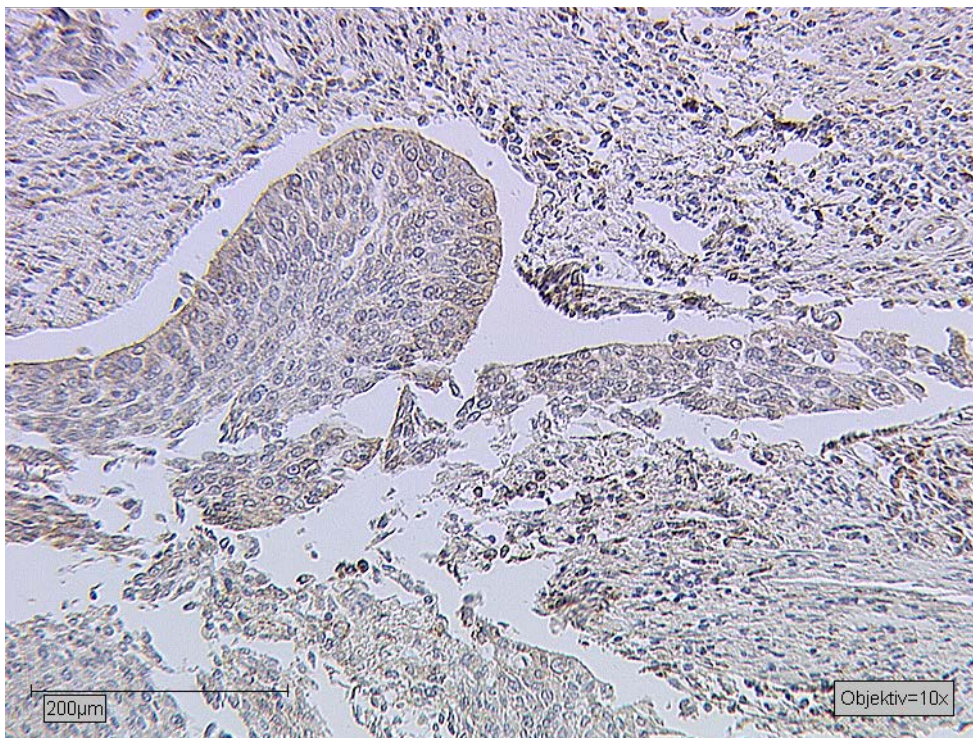


Abbildung 14a: T1-Karzinom mit schwacher Expression von E6 im Zytoplasma





*Abbildung 14b: T2-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im Zytoplasma*



*Abbildung 14c: T3-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im Zytoplasma*



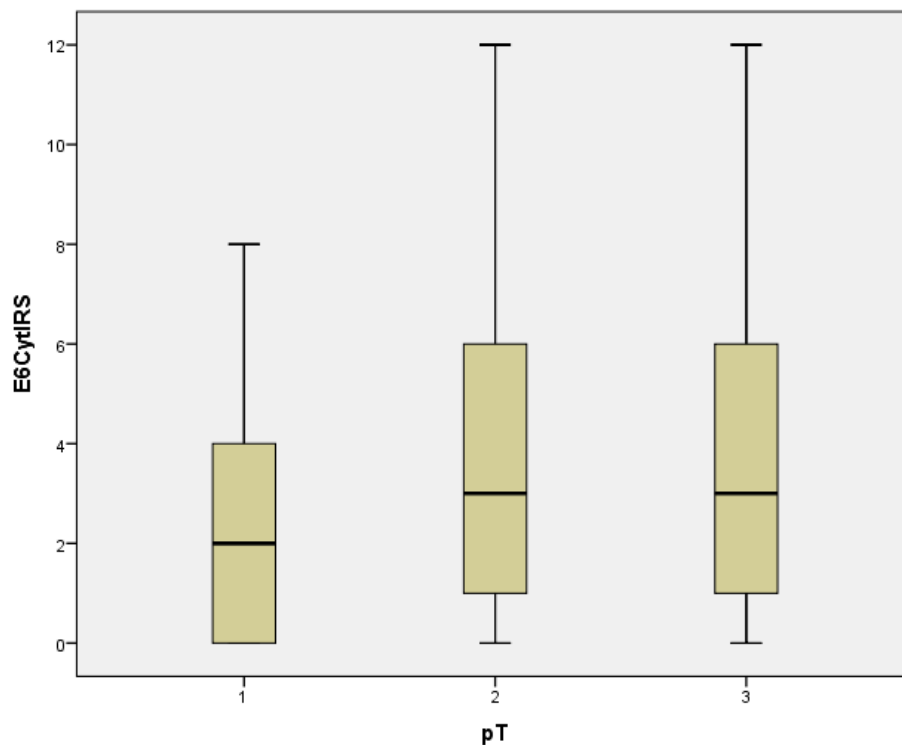
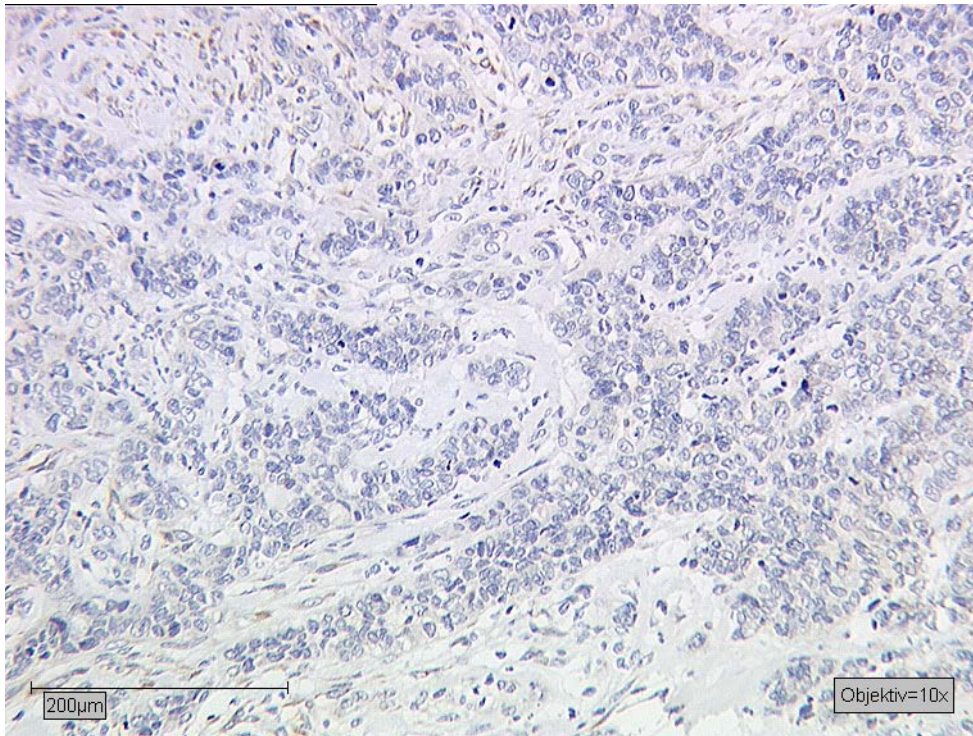


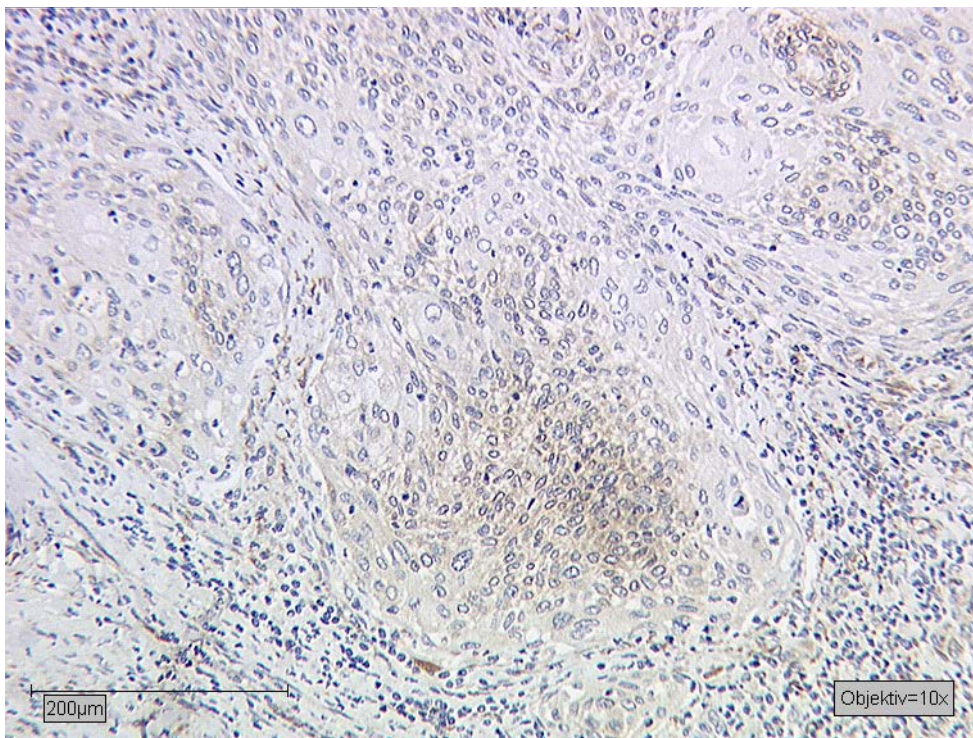
Abbildung 14d: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen E6-Expression lag bei Karzinomen mit T1-Status bei 2, bei Karzinomen mit T2- und T3-Status bei 3

### 5.1.2 E6 und FIGO-Stadium

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von E6 und der FIGO-Klassifikation ( $p < 0,001$ ): je höher das FIGO-Stadium, desto stärker wurde E6 exprimiert. Mit FIGO 1 bewertete Karzinome zeigten eine niedrige E6-Expression, der mittlere IRS lag bei 2 (Abbildung 15a). Mit FIGO 2 (Abbildung 15b) und FIGO 3 (Abbildung 15c) bewertete Karzinome zeigten einen mittleren IRS von 4. Als FIGO 4 eingestufte Karzinome wiesen einen mittleren IRS von 6 (Abbildung 15d) auf und exprimierten somit E6 stärker als FIGO 1, FIGO 2 und FIGO 3. Abbildung 15e zeigt eine Zusammenfassung der Färbeargebnisse in Form eines Boxplot-Diagramms. (Korrelationskoeffizient  $Rho = 0,227$ ,  $p < 0,001$ ).



*Abbildung 15a: FIGO 1-Karzinom mit schwacher E6-Expression im Zytoplasma*



*Abbildung 15b: FIGO 2-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im Zytoplasma*



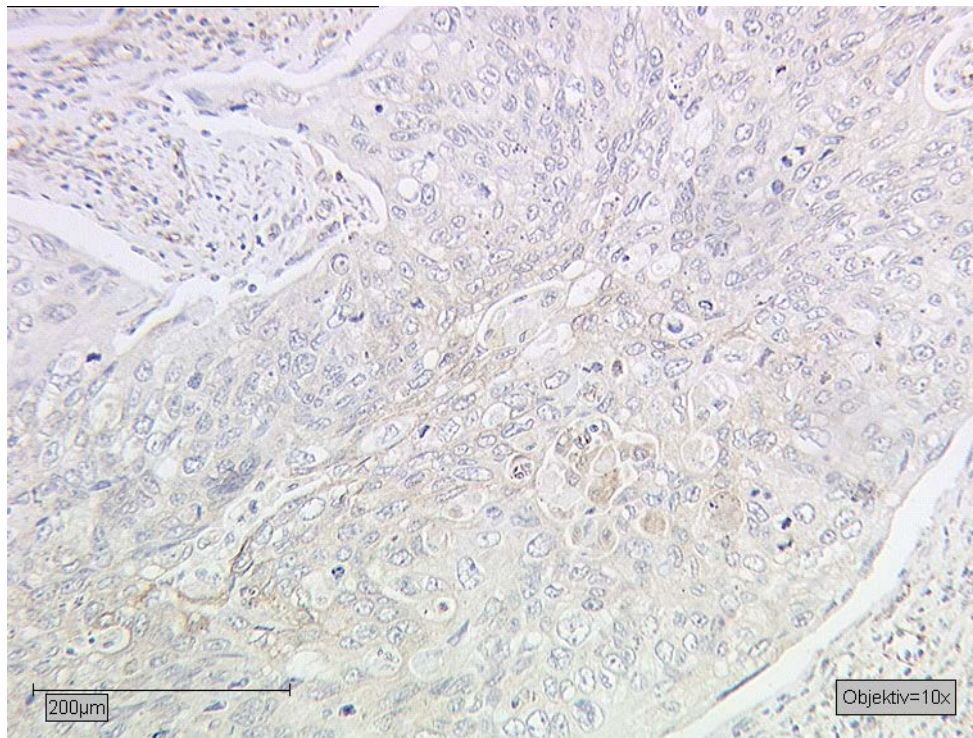


Abbildung 15c: FIGO 3-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im Zytoplasma

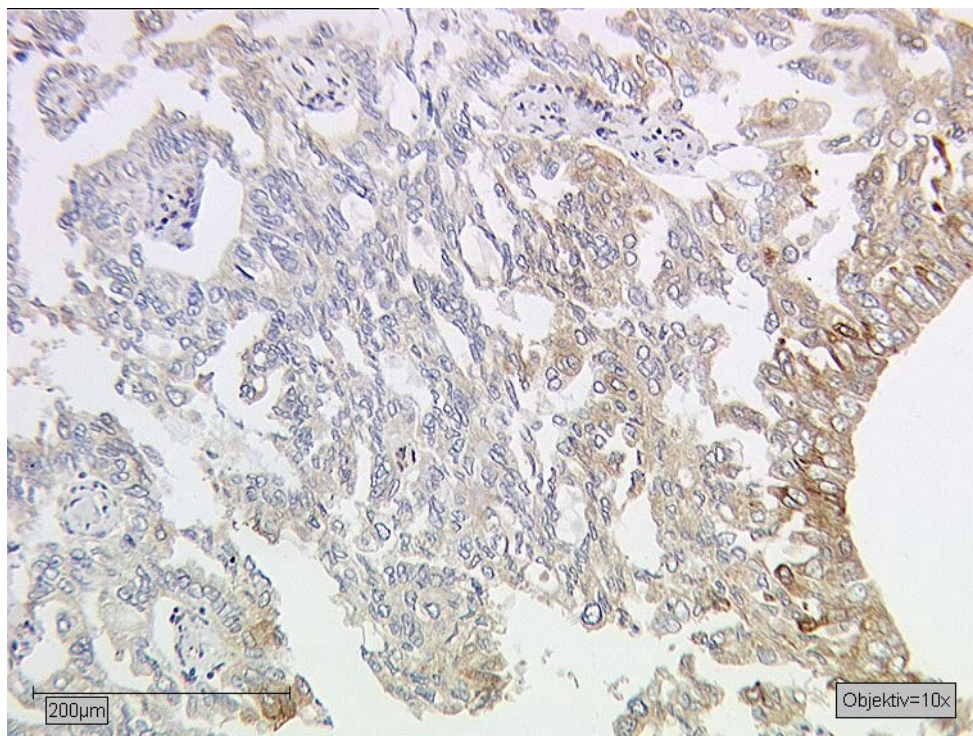
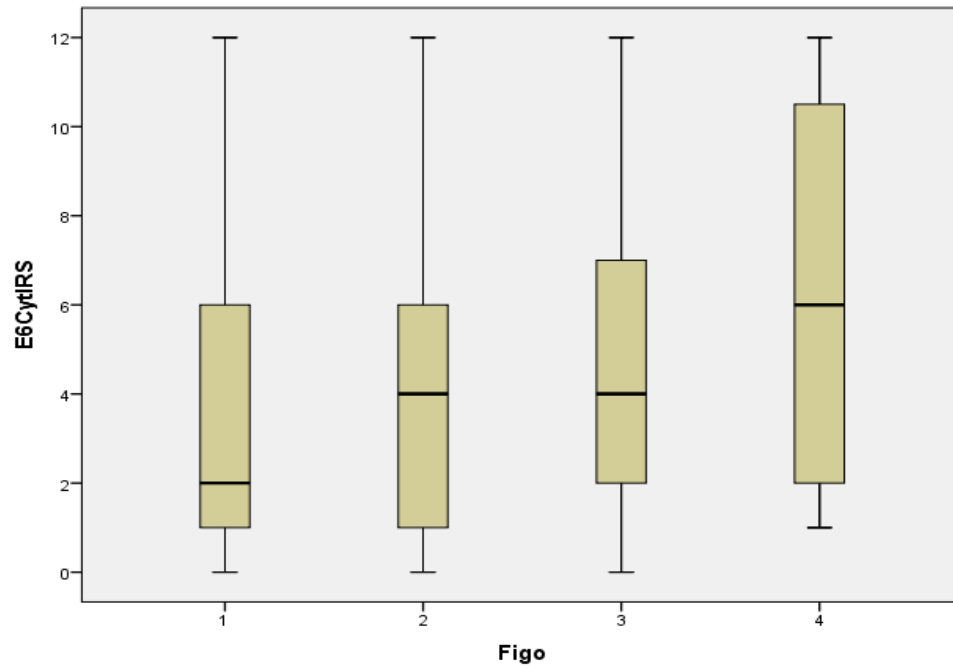


Abbildung 15d: FIGO 4-Karzinom mit starker E6-Expression im Zytoplasma

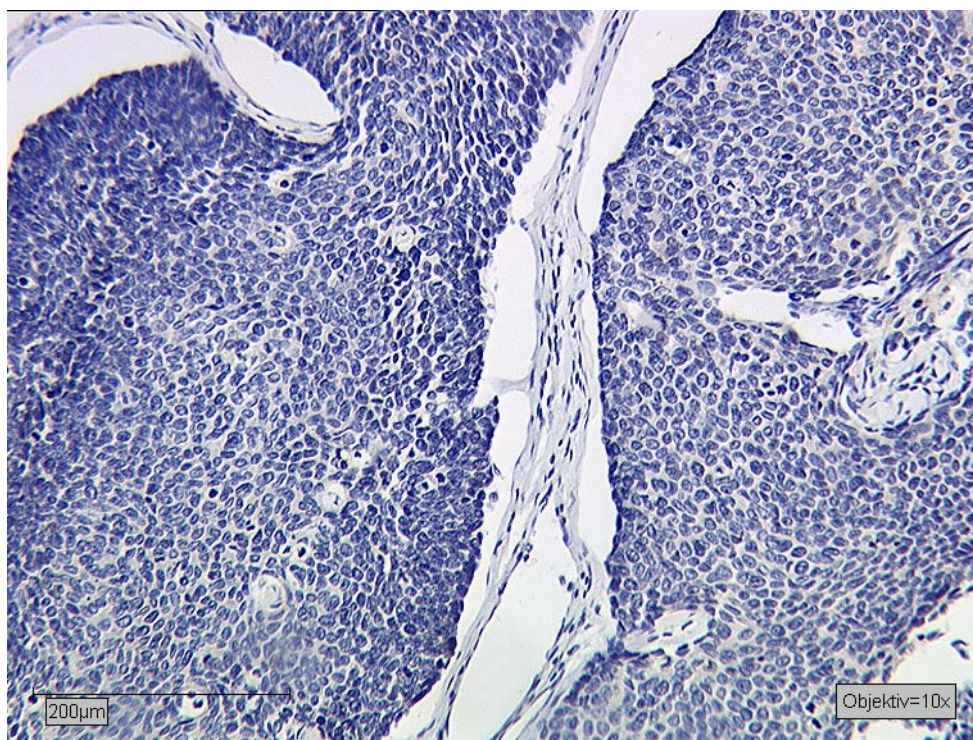


*Abbildung 15e: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von E6 lag für FIGO 1-Karzinome bei 2, für FIGO 2- und FIGO 3-Karzinome bei 4 und für FIGO 4-Karzinome bei 6*



### 5.1.3 E6 und histologischer Subtyp

Es zeigte sich, dass die beiden histologischen Subtypen Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom das E6-Onkoprotein unterschiedlich stark exprimierten. Plattenepithelkarzinome zeigten als mittleren IRS einen Score von 2 (Abbildung 16a), wohingegen Adenkarzinome einen mittleren IRS von 5 ( $p=0,015$ ) (Abbildung 16b) aufwiesen und somit E6 stärker exprimierten. Abbildung 16c zeigt eine Zusammenfassung der Färbeergebnisse mit Bezug auf den histologischen Subtyp in Form eines Boxplot-Diagramms.



*Abbildung 16a: Plattenepithelkarzinom mit geringer E6-Expression im Zytoplasma*

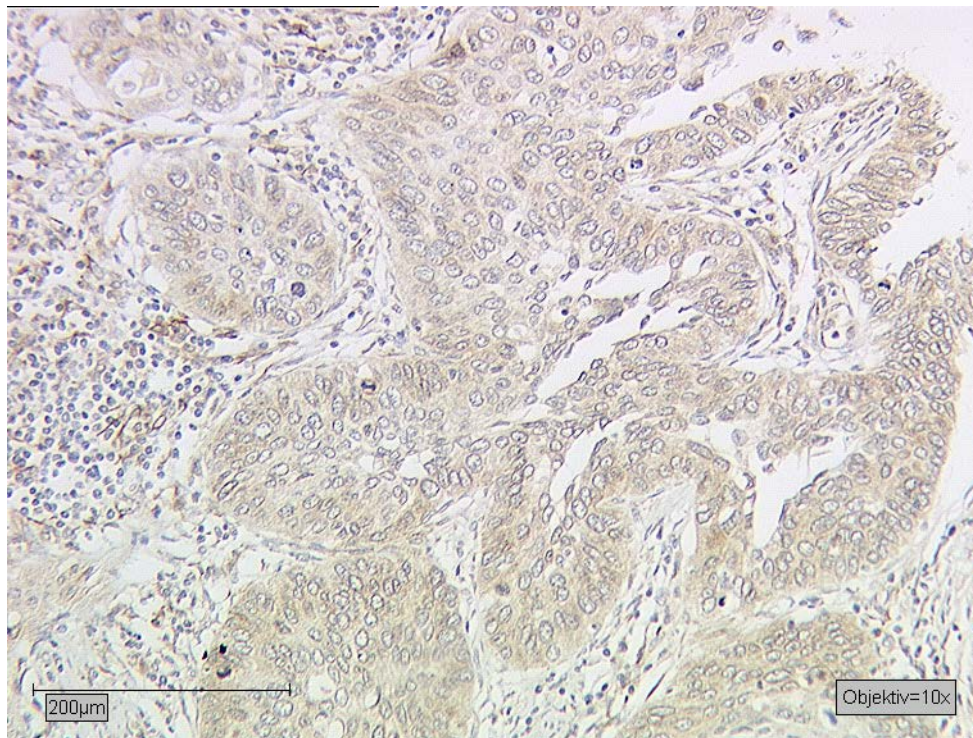


Abbildung 16b: Adenokarzinom mit deutlicher E6-Expression im Zytoplasma

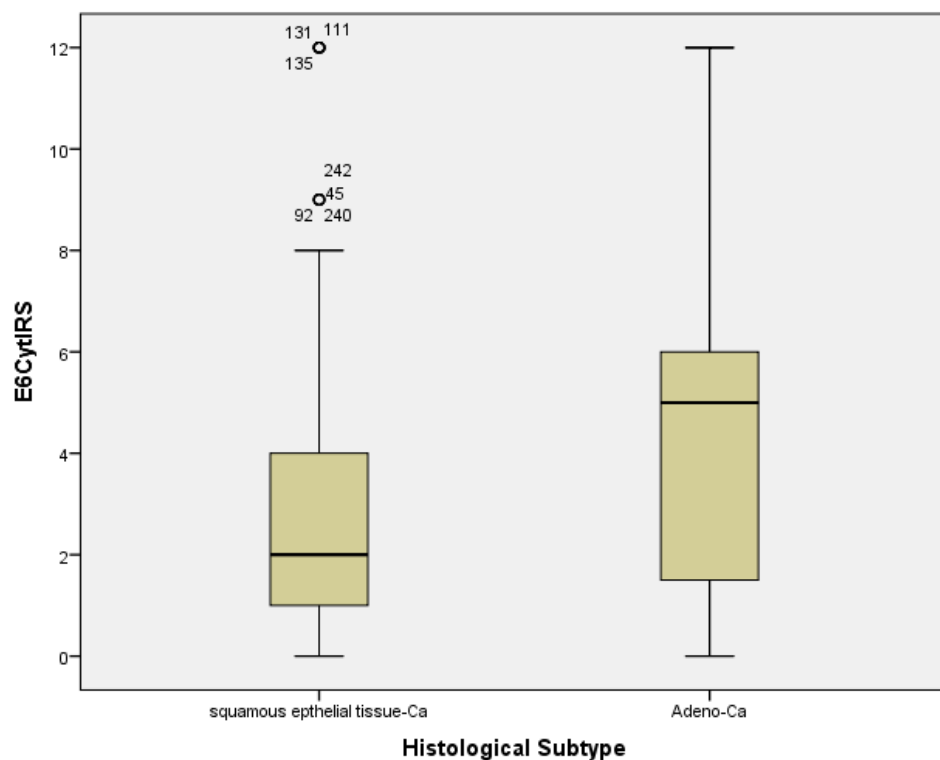


Abbildung 16c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von E6 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 2, bei Adenokarzinomen bei 5

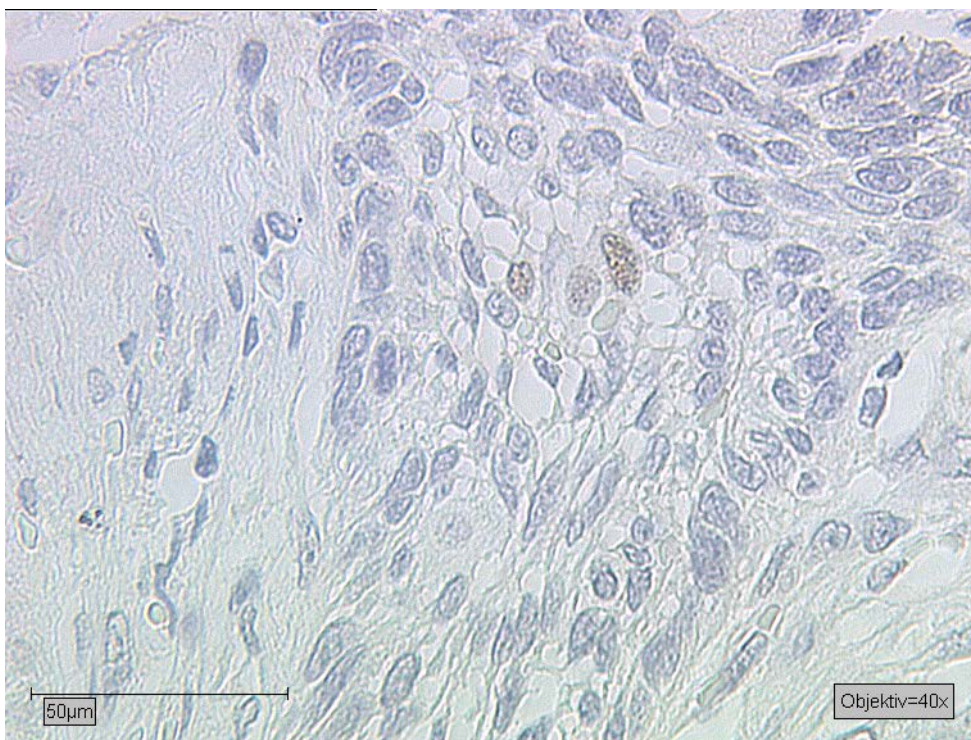


## 5.2 Expression von p53

p53 wurde im Kern von 60%, im Zytoplasma von 66% der Präparate exprimiert.

### 5.2.1 p53 im Kern und histologischer Subtyp

Es stellte sich heraus, dass p53 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp unterschiedlich stark exprimiert wurde. Bei Plattenepithelkarzinomen lag der mittlere IRS für die nukleäre Expression bei 1 (Abbildung 17a), bei Adenokarzinomen hingegen bei 0 ( $p=0,024$ ) (Abbildung 17b). Abbildung 17c stellt die Expression von p53 im Kern in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp graphisch in Form eines Boxplot-Diagramms dar.



*Abbildung 17a: Plattenepithelkarzinom mit schwacher Expression von p53 im Kern*

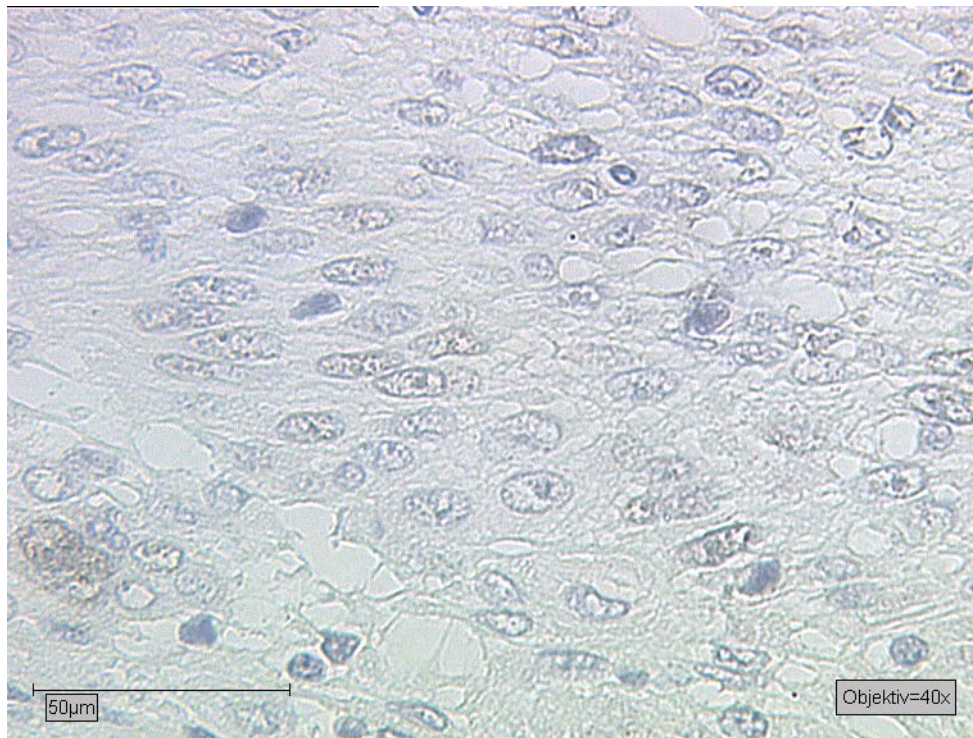


Abbildung 17b: Adenokarzinom mit sehr schwacher Expression von p53 im Kern

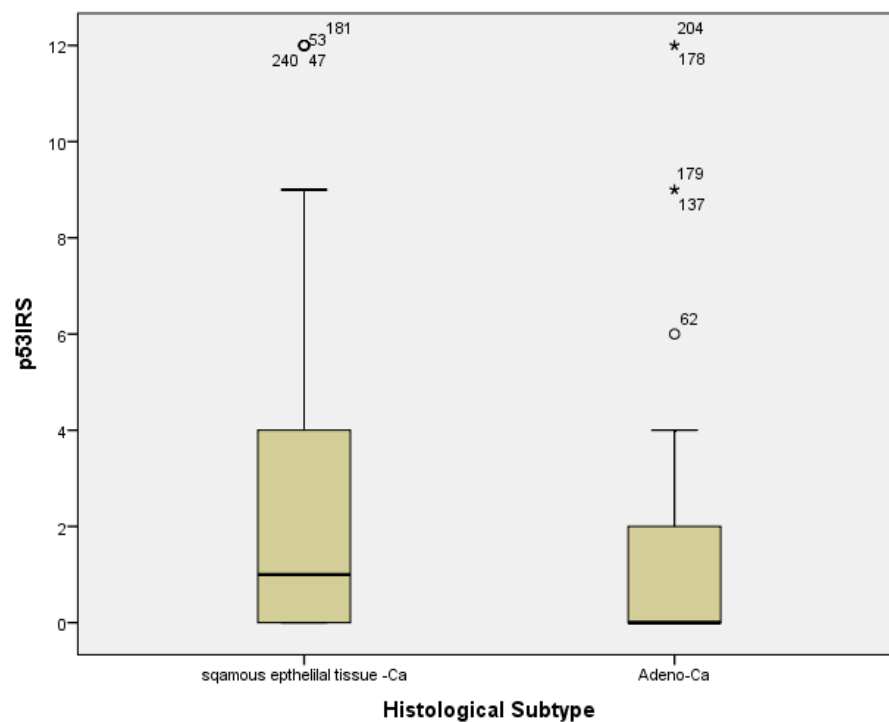
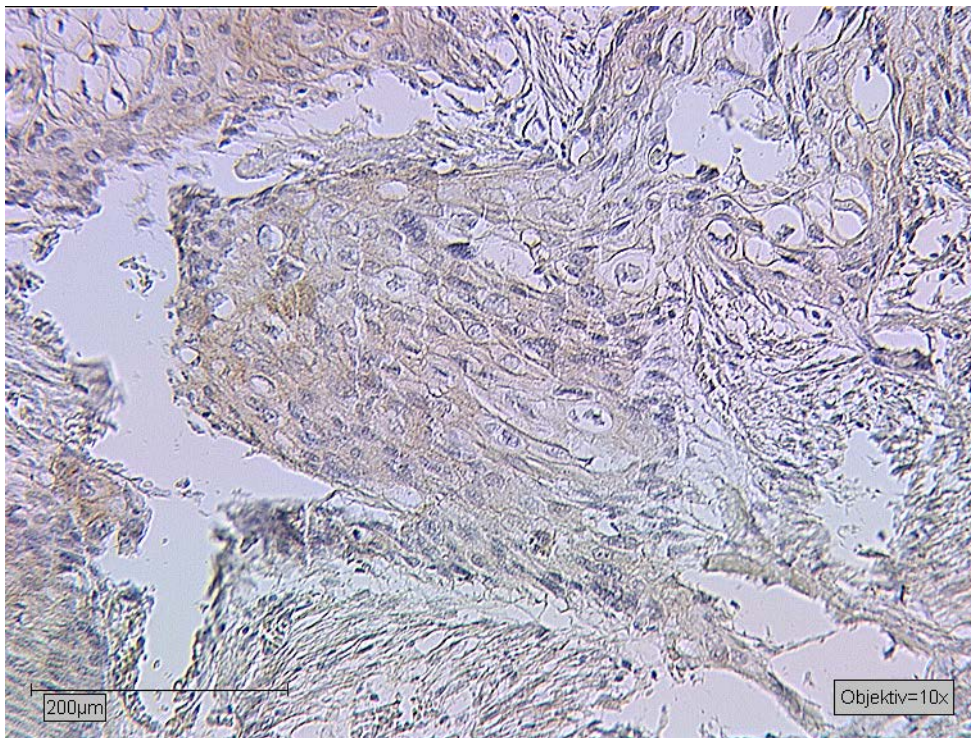


Abbildung 17c: Boxplot: der mittlere IRS der nukleären Expression von p53 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 1, bei Adenokarzinomen bei 0



### 5.2.2 p53 im Zytoplasma und histologischer Subtyp

Nicht nur die Expression von p53 im Nukleus war je nach histologischem Subtyp unterschiedlich, sondern auch die im Zytoplasma. Plattenepithelkarzinome wiesen einen mittleren IRS von 3 auf (Abbildung 18a), Adenokarzinome von 0 ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 18b). Abbildung 18c fasst die zytoplasmatische Expression von p53 in Zusammenhang mit den histologischen Subtypen in Form eines Boxplot-Diagramms zusammen.



*Abbildung 18a: Plattenepithelkarzinom mit mäßiger Expression von p53 im Zytoplasma*

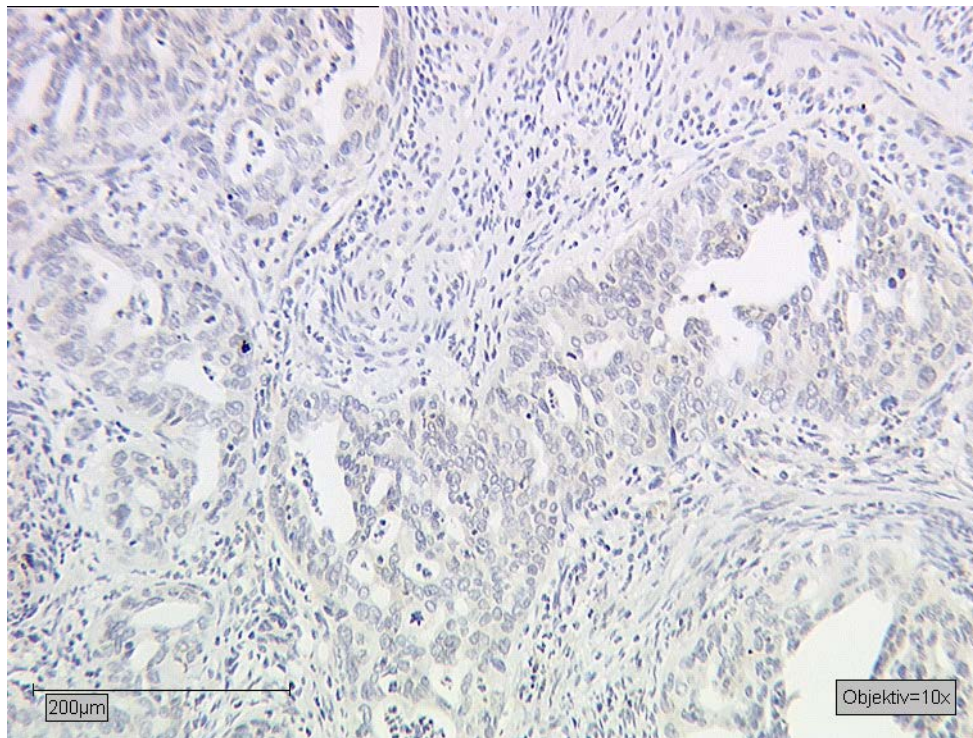


Abbildung 18b: Adenokarzinom mit sehr schwacher Expression von p53 im Zytoplasma

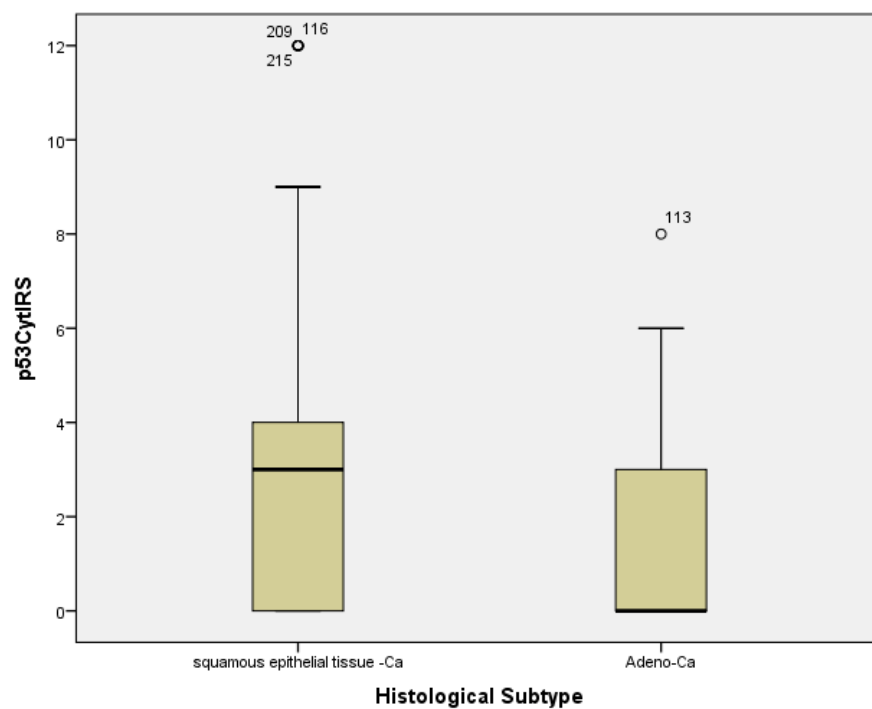


Abbildung 18c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von p53 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 3, bei Adenokarzinomen bei 0

## 5.3 Expression von p53 mutiert

42% der Schnitte zeigten eine nukleäre Expression der mutierten Form von p53, 67% eine zytoplasmatische.

### 5.3.1 Nukleäre Expression von p53 mutiert: Überlebensvorteil gegenüber keiner nukleären Expression

Es zeigte sich, dass Patientinnen, die die mutierte Form von p53 im Kern exprimierten, einen Überlebensvorteil gegenüber denjenigen Patientinnen hatten, bei denen keine nukleäre Expression vorlag. Abbildung 19 veranschaulicht in Form einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve welchen Unterschied die nukleäre Expression in Bezug auf das Überleben macht.

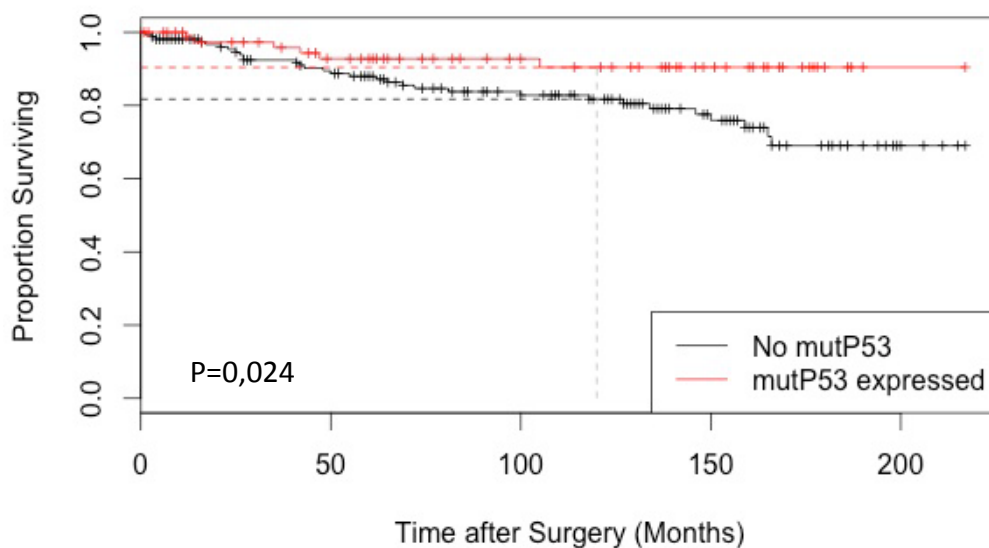


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine nukleäre Expression der mutierten Form von p53, rot: nukleäre Expression der mutierten Form von p53. Es zeigte sich ein Überlebensvorteil für die Patientinnen, deren Tumore die mutierte Form von p53 im Nukleus exprimierten.

Allerdings war nur ein Überlebensvorteil zwischen Expression und Nicht-Expression zu ermitteln, was die Expression im Kern betrifft. Ob die mutierte Form von p53 im Zytoplasma exprimiert wurde oder nicht, beeinflusste das Überleben nicht. Abbildung 20 stellt in Form einer Kaplan-Meier-Kurve dar, dass kein Unterschied zwischen beiden Gruppen vorlag.

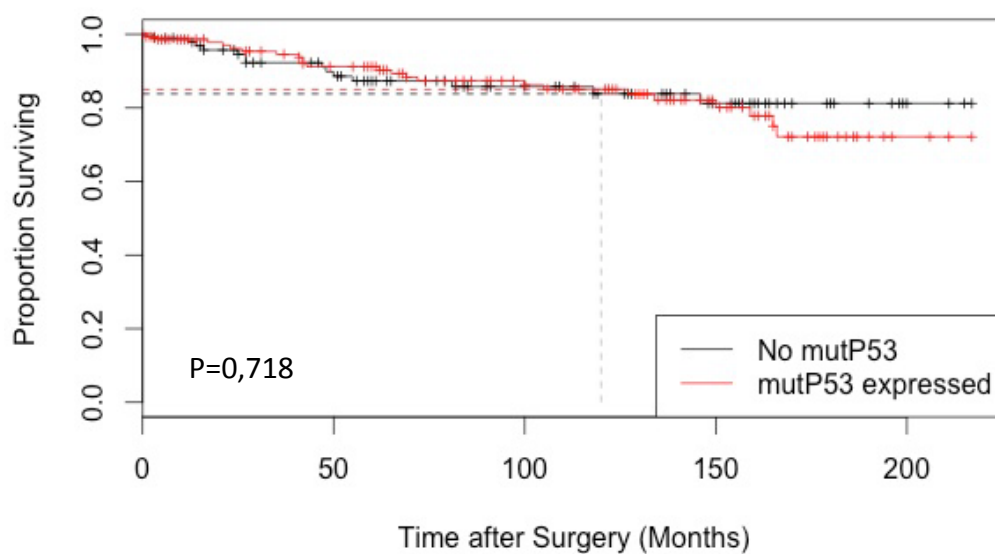
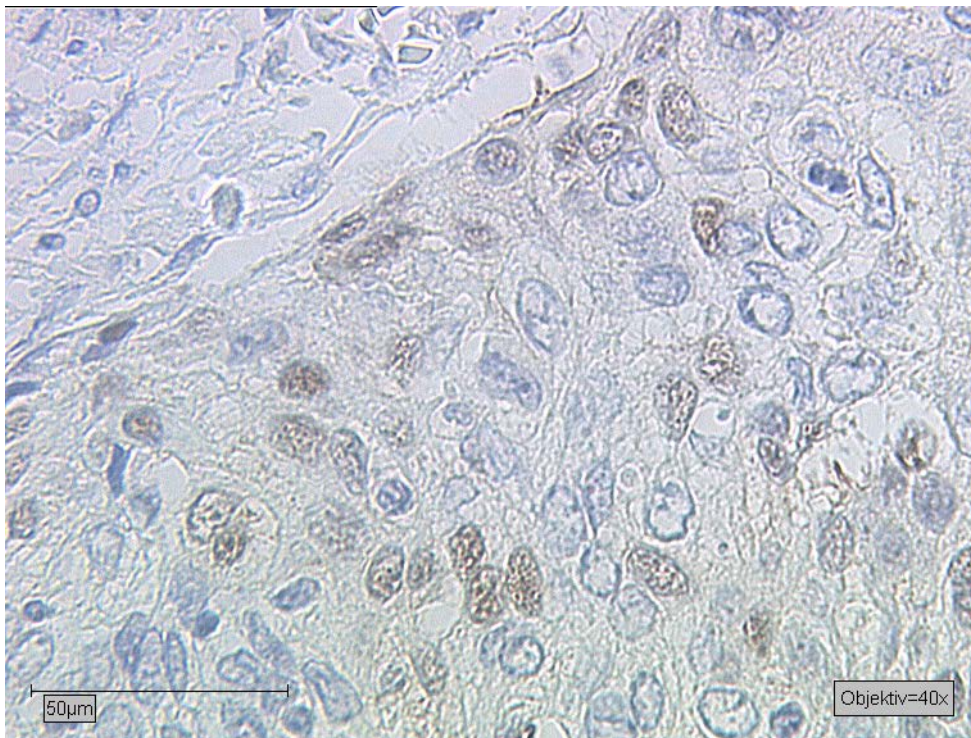


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine zytoplasmatische Expression der mutierten Form von p53, rot: zytoplasmatische Expression der mutierten Form von p53. Es zeigte sich, dass die Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma der Tumore keinen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen hatte.



### 5.3.2 p53 mutiert und histologischer Subtyp

Obwohl die mittlere nukleäre Expression der mutierten Form von p53 sowohl das Plattenepithel- (Abbildung 21a), als auch das Adenokarzinom (Abbildung 21b) betreffend 0 war, waren die Unterschiede zwischen beiden signifikant ( $p=0,011$ ). Abbildung 21a zeigt eine mäßige nukleäre Expression der mutierten Form von p53, Abbildung 21b zeigt eine sehr schwache nukleäre Expression. Eine Zusammenfassung der nukleären Expression der mutierten Form von p53 wird in Abbildung 21c dargestellt.



*Abbildung 21a: Plattenepithelkarzinom mit mittlerer Expression der mutierten Form von p53 im Nukleus*

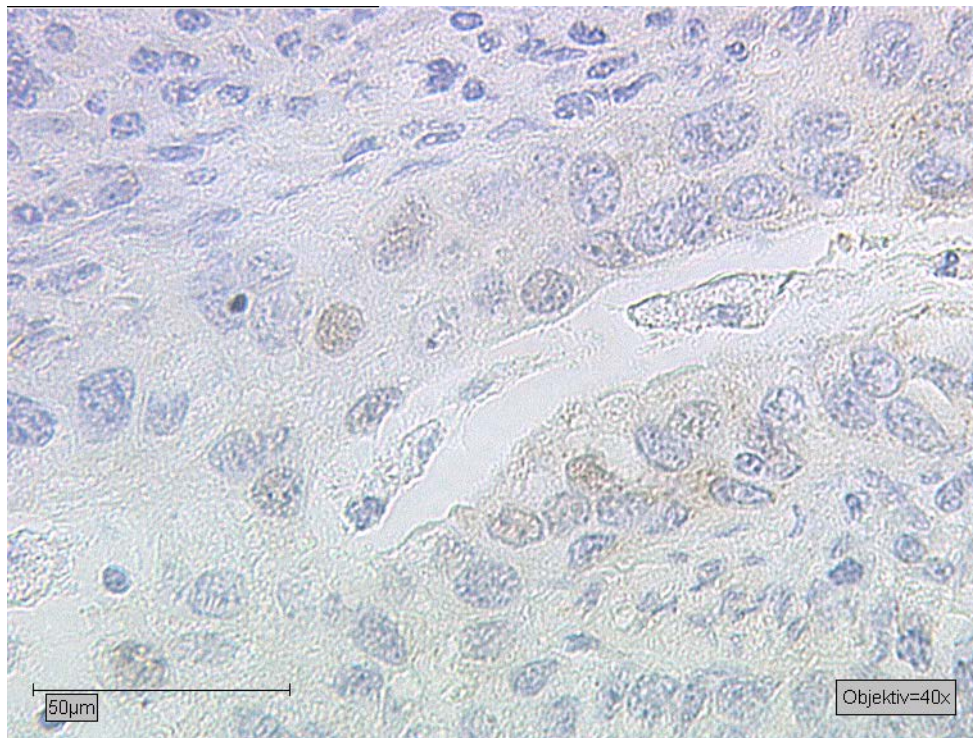


Abbildung 21b: Adenokarzinom mit schwacher Expression der mutierten Form von p53 im Nukleus

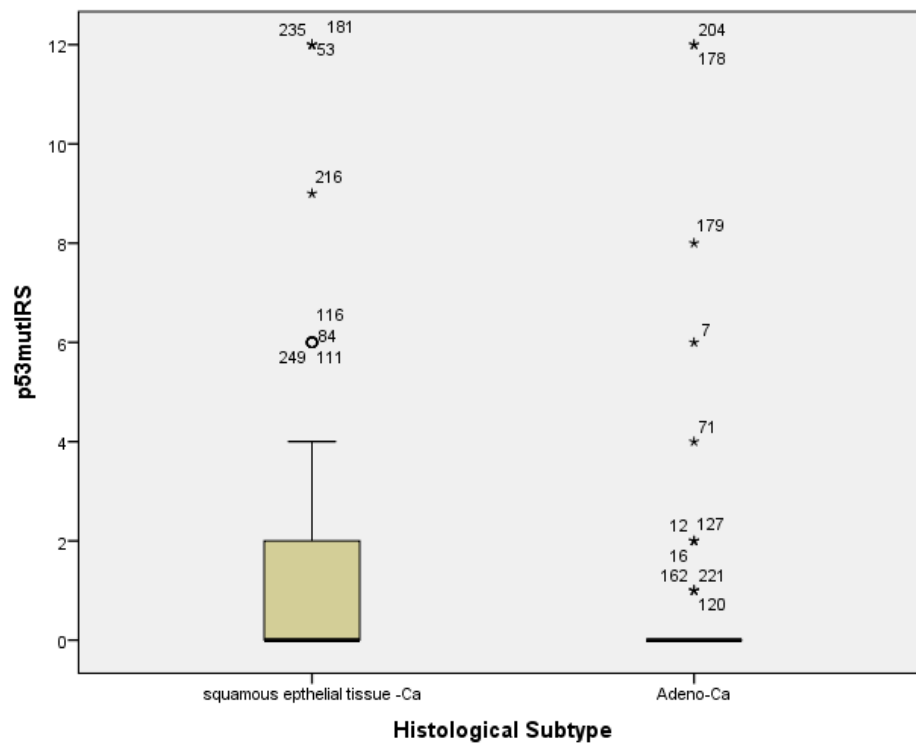
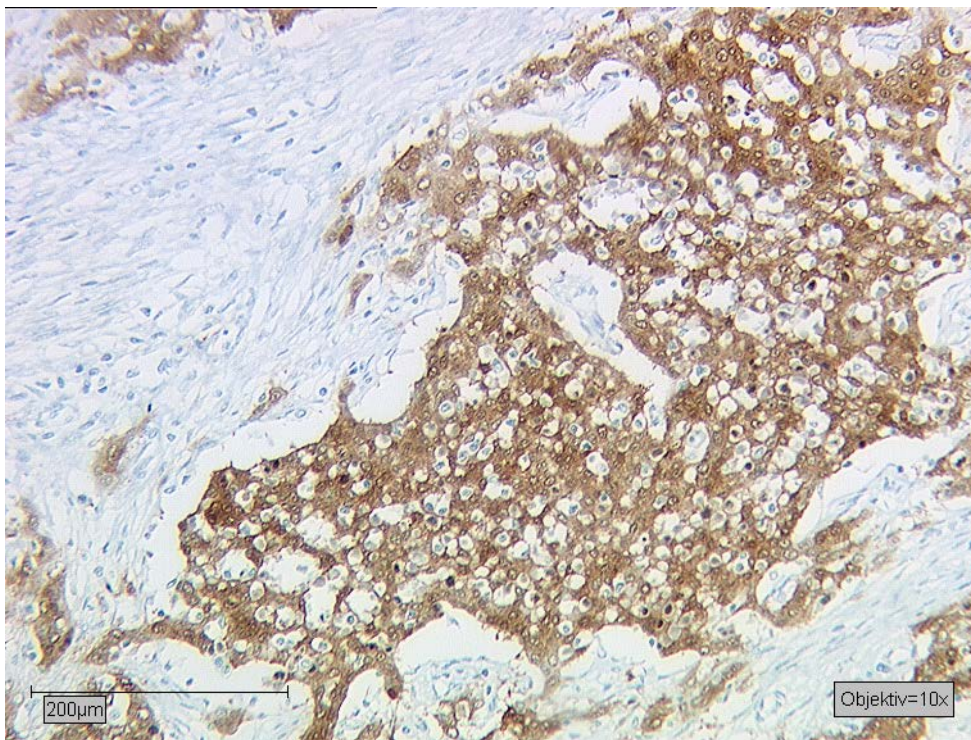


Abbildung 21c: Boxplot: der mittlere IRS der nukleären Expression der mutierten Form von p53 lag beim Plattenepithelkarzinom und beim Adenokarzinom bei 0



## 5.4 Expression von p16

Am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München wird eine HPV-Infektion routinemäßig anhand der p16-Überexpression diagnostiziert (36). Es zeigten 94% der Fälle eine p16-Expression und 61% der Fälle konnten als p16-überexpressiert bewertet werden. p16 wurde ja nach histologischem Subtyp unterschiedlich exprimiert. Plattenepithelkarzinome (Abbildung 22a) zeigten einen mittleren zytoplasmatischen IRS von 6, bei Adenokarzinomen (Abbildung 22b) lag der mittlere zytoplasmatische IRS bei 4 ( $p < 0,001$ ). Abbildung 22c stellt die Ergebnisse der zytoplasmatischen Expression von p16 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp grafisch dar.



*Abbildung 22a: Plattenepithelkarzinom mit starker p16-Expression im Zytoplasma*

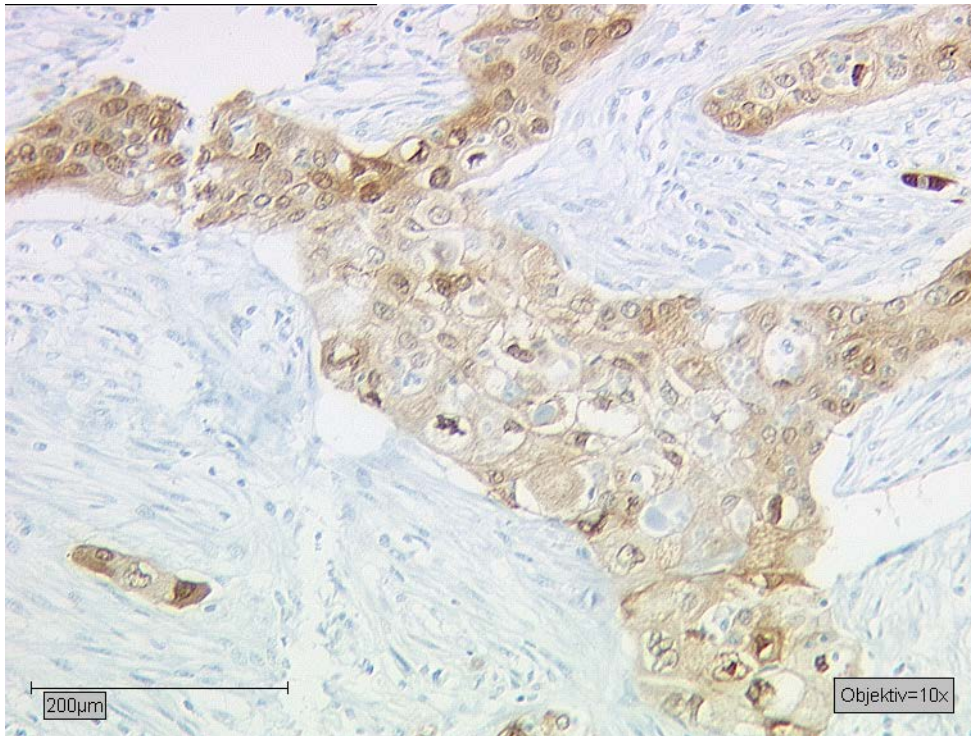


Abbildung 22b: Adenokarzinom mit mäßiger p16-Expression im Zytoplasma

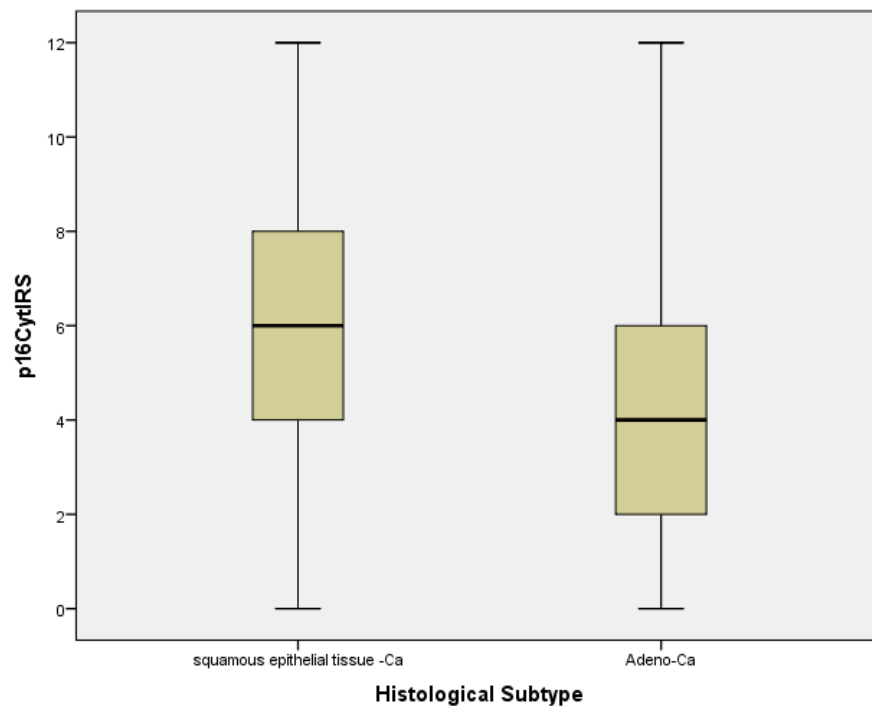


Abbildung 22c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von p16 lag beim Plattenepithelkarzinom bei 6, beim Adenokarzinom bei 4



## 5.5 Positive Korrelation zwischen MDM2 und Galektin-3

98% der Fälle exprimierten MDM2 und 89% Galektin-3 (gal-3).

Es zeigte sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen MDM2 und gal-3

( $Rho = 0,181$ ,  $p = 0,005$ ). Zervixkarzinomfälle mit niedriger MDM2-Expression

(Abbildung 23a) zeigten auch eine niedrige gal-3-Expression (Abbildung 23b). Ebenso

wiesen Fälle mit hoher MDM2-Expression (Abbildung 23c) auch eine hohe gal-3-Expression

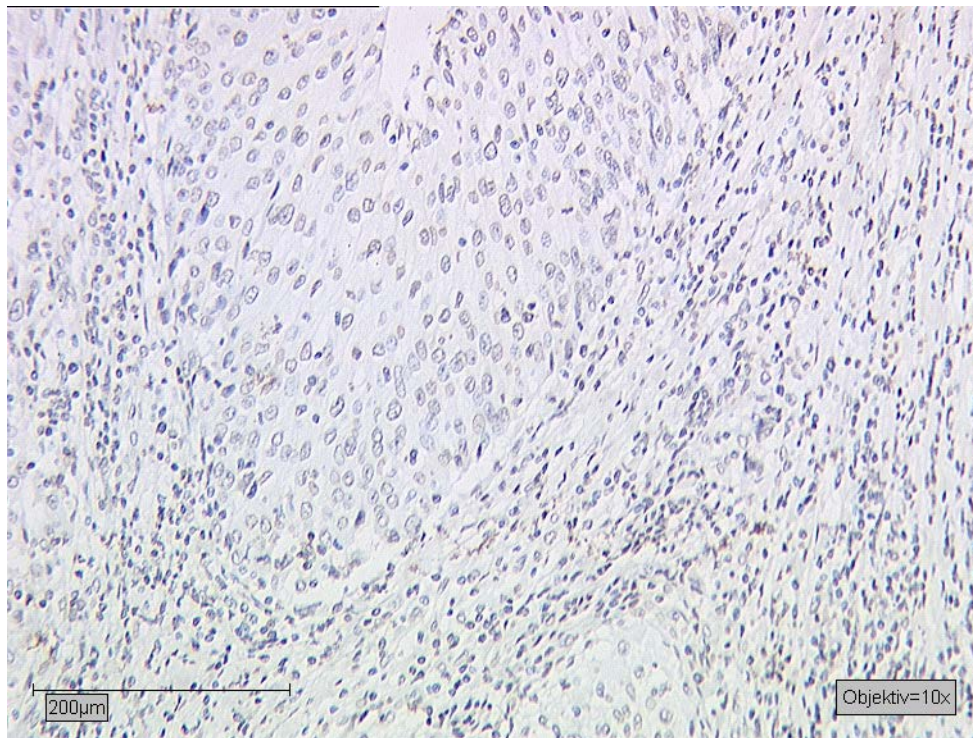
auf (Abbildung 23d). Abbildung 23a und Abbildung 23b zeigen denselben Ausschnitt

desselben Karzinoms, bei Abbildung 23a wurde der Schnitt mit MDM2 gefärbt, bei

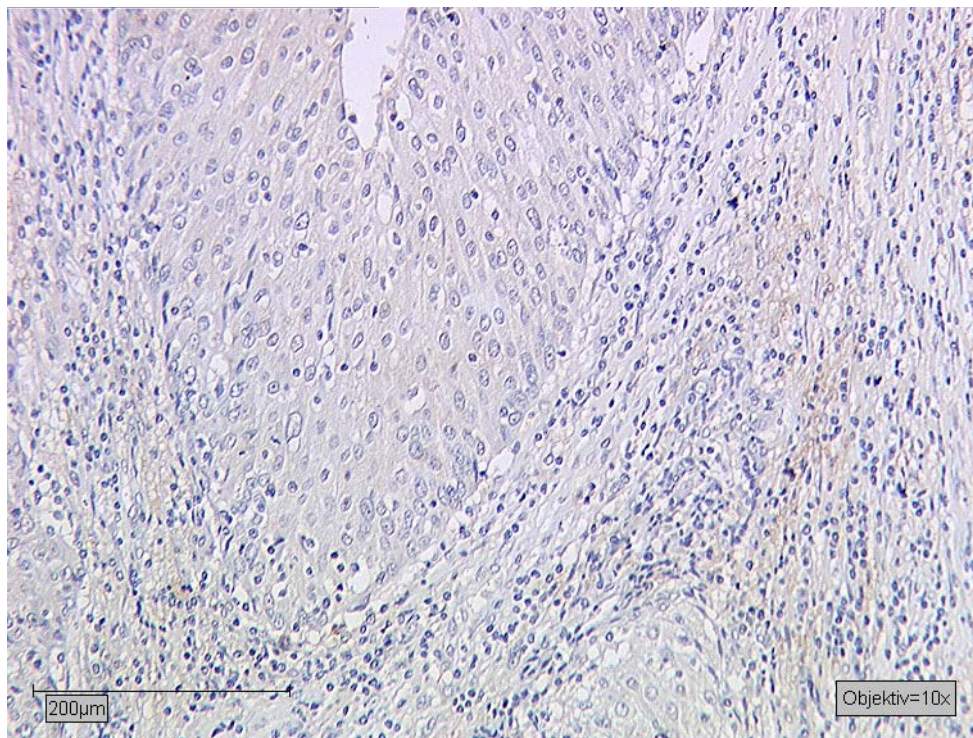
Abbildung 23b mit gal-3. Abbildung 23c und Abbildung 23d zeigen einen anderen Fall,

ebenfalls denselben Ausschnitt desselben Karzinoms, einmal mit MDM2 gefärbt

(Abbildung 23c), einmal mit gal-3 gefärbt (Abbildung 23d).

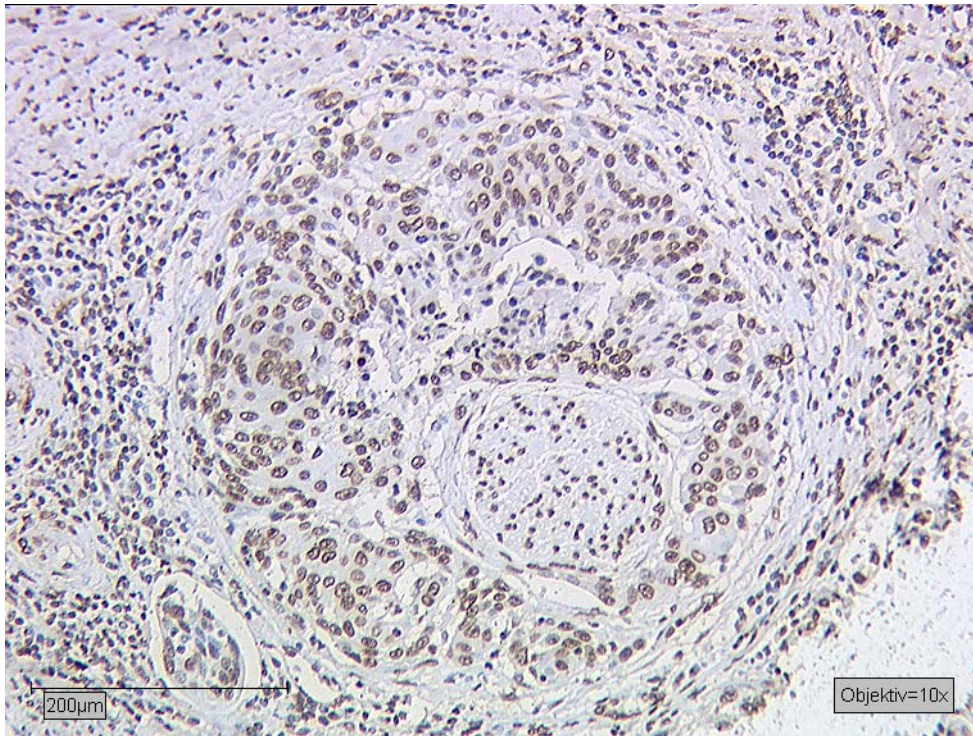


*Abbildung 23a: Adenokarzinom: schwache Expression von MDM2 im Kern*

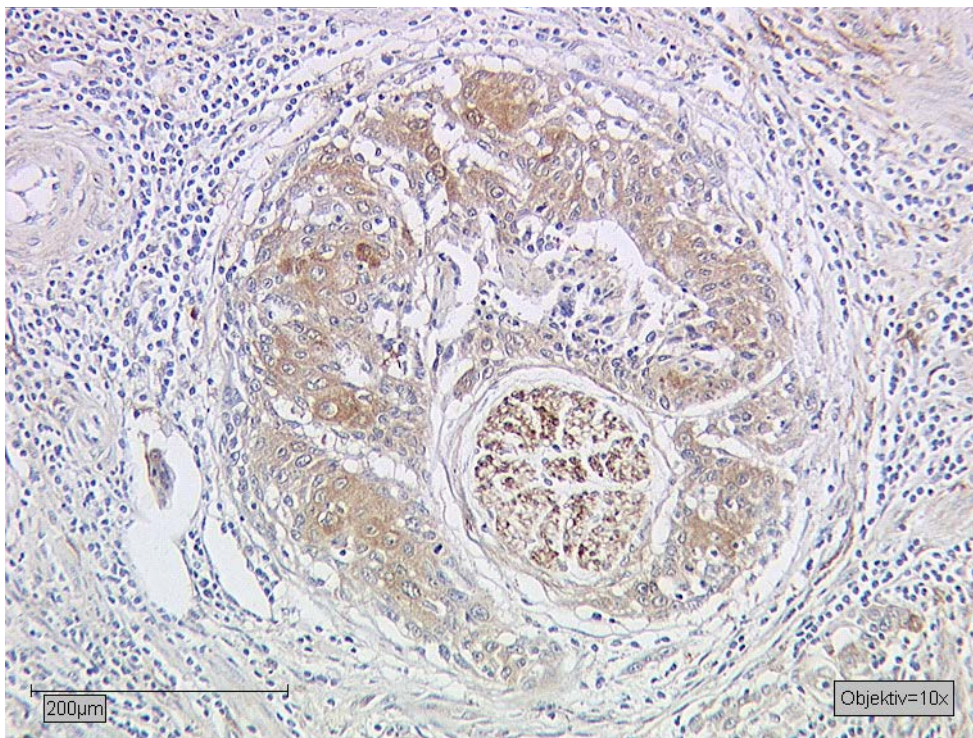


*Abbildung 23b: Adenokarzinom: schwache Expression von gal-3 im Zytoplasma*





*Abbildung 23c: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von MDM2 im Kern*

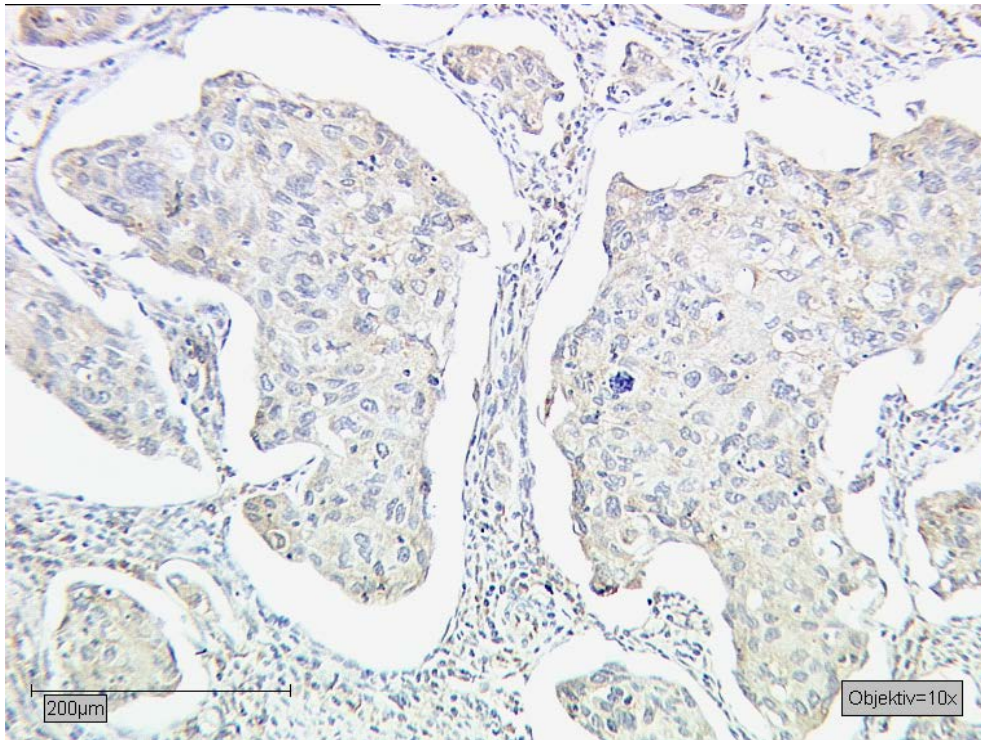


*Abbildung 23d: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von gal-3 im Zytoplasma*

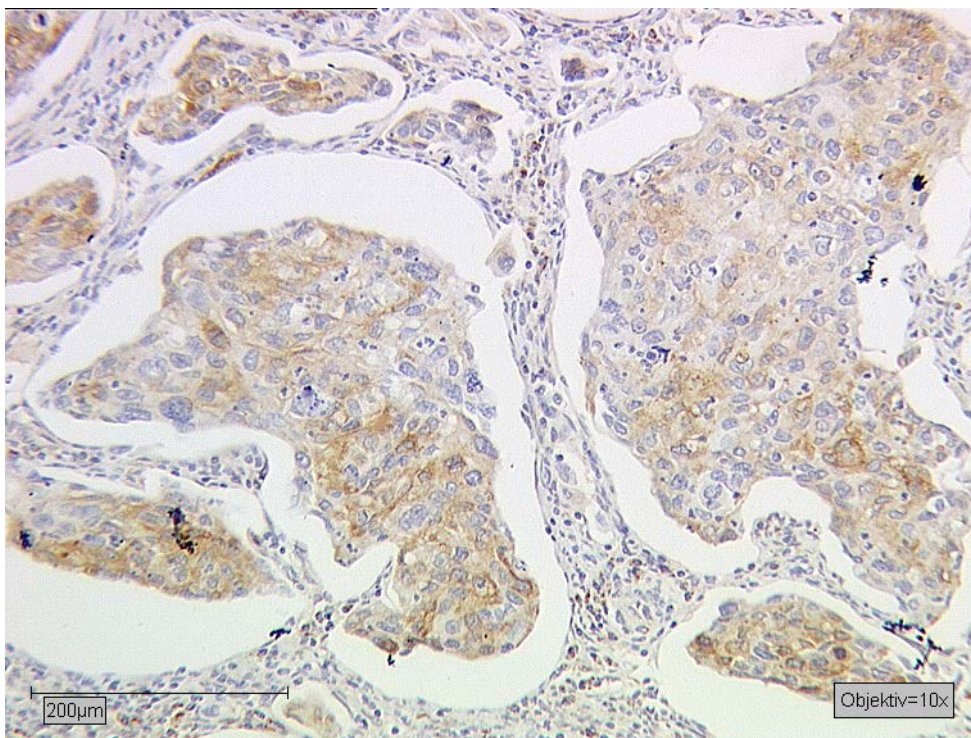
## 5.6 Negative Korrelation zwischen E6 und p53 mutiert

Es konnte eine signifikante, negative Korrelation zwischen E6 und der mutierten Form von p53 nachgewiesen werden ( $Rho = -0,140$ ,  $p = 0,028$ ). Zervixkarzinomfälle mit niedriger Expression des E6-Onkoproteins (Abbildung 24a) wiesen eine hohe Expression der mutierten Form von p53 auf (Abbildung 24b). Auch zeigten Fälle mit starker E6-Expression (Abbildung 24c) eine sehr niedrige Expression der mutierten Form von p53 (Abbildung 24d). Abbildung 24a und Abbildung 24b zeigen denselben Ausschnitt desselben Karzinoms, bei Abbildung 24a wurde der Schnitt mit E6 gefärbt, bei Abbildung 24b mit der mutierten Form von p53. Abbildung 24c und Abbildung 24d zeigen einen anderen Fall, ebenfalls denselben Ausschnitt desselben Karzinoms, einmal mit E6 gefärbt (Abbildung 24c), einmal mit der mutierten Form von p53 gefärbt (Abbildung 24d).



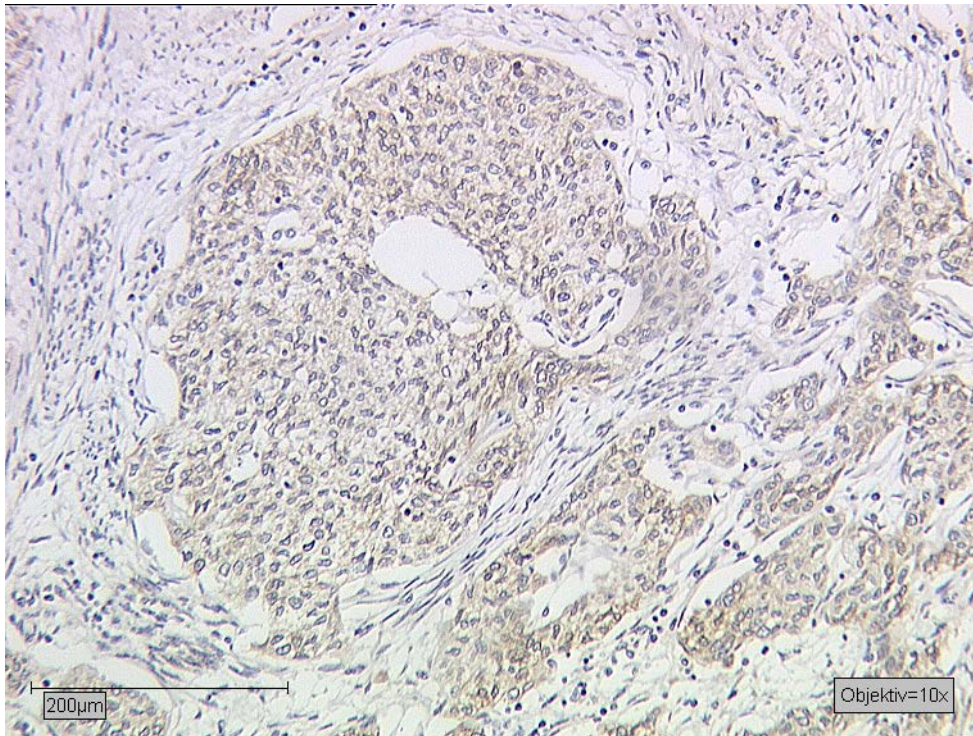


*Abbildung 24a: Plattenepithelkarzinom: schwache Expression von E6 im Zytoplasma*

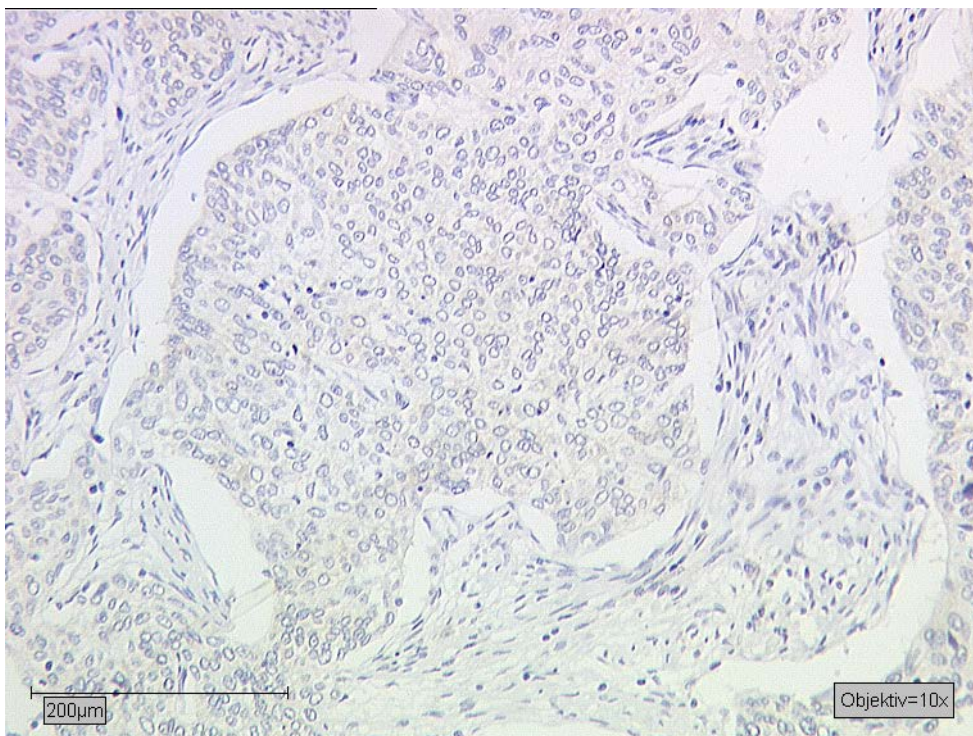


*Abbildung 24b: Plattenepithelkarzinom: starke Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma*





*Abbildung 24c: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von E6 im Zytoplasma*



*Abbildung 24d: Plattenepithelkarzinom: schwache Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma*

## 5.7 Galektin-3: negativer Prognosefaktor bei p16-negativen Fällen

Es zeigte sich, dass bei Patientinnen, die kein oder nur wenig p16 exprimierten, die Expression von gal-3 mit einer schlechten Prognose in Verbindung stand. Abbildung 25 zeigt diesen Zusammenhang anhand einer Kaplan-Meier-Kurve.

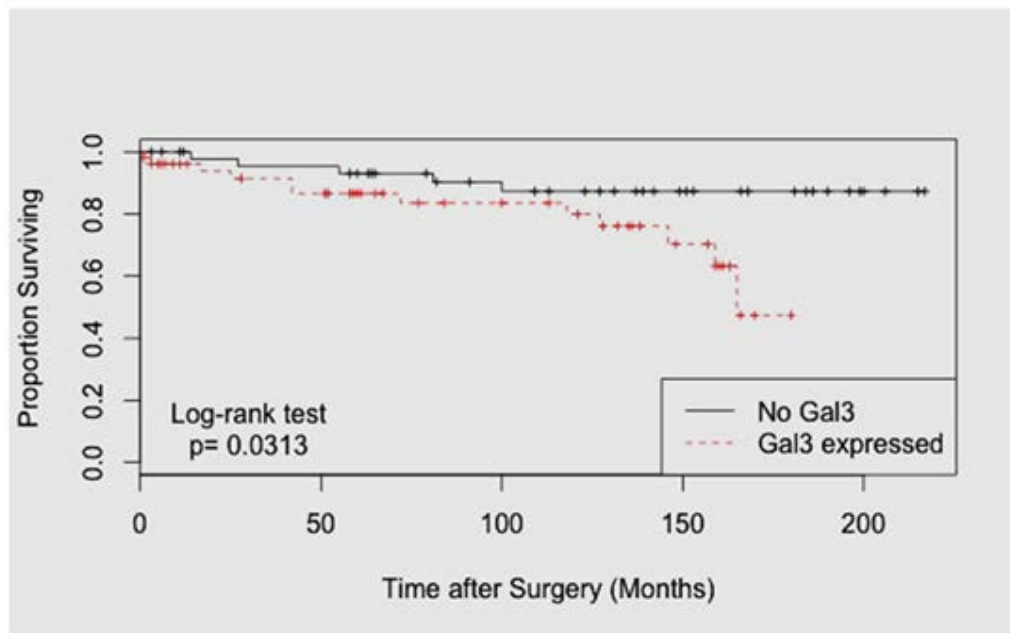


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine Expression von gal-3 bei p16-negativen Patientinnen im Zytoplasma, rot: Expression von gal-3 bei p16-negativen Patientinnen im Zytoplasma. Es zeigte sich, dass p16-negative Patientinnen, die gal-3 im Zytoplasma ihrer Tumore exprimierten, einen Überlebensnachteil gegenüber p16-negativen Patientinnen, deren Tumore keine gal-3-Expression im Zytoplasma zeigten, hatten.

## 6. Diskussion

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (1). Hauptursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist die persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren (3-6). Untersuchungen von Walboomers et al, sowie von Munoz et al kamen zu dem Ergebnis, dass die weltweite HPV-Prävalenz Zervixkarzinome betreffend bei über 90% liegt (54, 55). Aufgrund ihrer geringen Genomgröße kodieren Humane Papillomaviren selbst nicht alle Funktionen, die für ihre Replikation notwendig sind und sind somit auf eine Wirtszelle angewiesen (7). Folglich steht ihr Replikationszyklus in engem Zusammenhang mit der Differenzierung der befallenen Wirtszelle (75). Durch Mikrotraumen beim Geschlechtsverkehr werden die Zellen exponiert und damit zugänglich für die Viren (8, 34, 76, 78). Sich differenzierende Zellen teilen sich nicht mehr und treten normalerweise, d.h. in nicht-infiziertem Epithel, aus dem Zellzyklus aus (8, 85, 86). Das Austreten der sich differenzierenden Zelle aus dem Zellzyklus stellt ein Problem für das Virus dar, da es für seine Replikation auf DNA-Polymerasen und Replikationsfaktoren der Wirtszelle angewiesen ist und diese nur in sich teilenden, nicht differenzierenden Zellen vorhanden sind (8). Das Virus muss sich aber in sich nicht mehr teilenden Zellen replizieren (8). Daher kommt es, wenn die infizierte Keratinozyte beginnt, sich zu differenzieren und damit den Zellzyklus verlässt, zu einer massiven Expression aller viralen Gene, auch E6 und E7 werden stark exprimiert, welche zu einer Dysregulation des Zellzyklus führen, wodurch die Amplifizierung des viralen Genoms in Zellen, die eigentlich den Zellzyklus verlassen haben, möglich wird (8, 79). Da die Expression der viralen Gene E6 und E7 zu einer Zellzyklusdysregulation führt (162, 163), wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Proteine, die eine Rolle im Zellzyklus spielen, untersucht. Hierzu wurden Paraffinschnitte von Zervixkarzinomen immunhistochemisch mit den Primärantikörpern E6, p53, mutierte Form von p53, p16, MDM2 und Galektin-3 gefärbt. Die Auswertung der erhaltenen Färbungen mittels IRS Score hatte zum Ziel, Aussagen über die jeweiligen Expressionen der verschiedenen Proteine treffen zu können und diese in Beziehung zu verschiedenen Parametern wie T-Status, FIGO-Stadium und histologischer Subtyp des Karzinoms setzen zu können. Außerdem wurde untersucht, ob die vermehrte Expression eines Proteins einen Überlebensvorteil bedeutet und ob die Expressionen der verschiedenen Proteine untereinander positiv beziehungsweise negativ korrelieren.



Um die durch E6 und E7 verursachte Zellzyklusdysregulation besser verstehen zu können, wird im Folgenden zunächst der nicht-dysregulierte, normale Ablauf des Zellzyklus einer eukaryontischen Zelle beschrieben.

Der Zellzyklus der eukaryontischen Zelle wird in 4 Phasen eingeteilt: G1-Phase („G“ steht für englisch „gap“ = Lücke), die Synthese-Phase (S-Phase), die G2-Phase und schließlich die Mitose-Phase (M-Phase) (164). In der S-Phase wird das Genom der Zellen durch DNA-Replikation verdoppelt (165) und in der M-Phase auf die beiden identischen Tochterzellen aufgeteilt (166, 167). In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf die Replikation der DNA in der S-Phase vor (168), in der G2-Phase auf die Mitose (166). Eine weitere Phase ist die sogenannte G0-Phase, ein Ruhestadium (166, 169, 170). Wenn die Zellen aufhören zu proliferieren, treten sie aus dem Zellzyklus aus und in die G0-Phase (Ruhephase), in der keine Zellteilung stattfindet, ein (166, 169, 170). Im Zellzyklus sind sogenannte Kontrollpunkte eingebaut: am Übergang von der G1-zur S-Phase, von der G2-zur M-Phase und in der S-Phase (171). Sie verhindern die Entstehung genetisch abnormaler Zellen, indem sie sicherstellen, dass kritische Vorgänge während einer bestimmten Phase des Zellzyklus beendet sind, bevor eine neue Phase beginnt (170, 172-174). Das Voranschreiten des Zellzyklus kann an diesen Kontrollpunkten unterbrochen werden, z.B. wenn ein Fehler in der DNA entdeckt wird (172, 175). So wird Zeit zur Reparatur geschaffen (176). Nach der Reparatur schreitet der Zellzyklus wieder voran (172). Falls der Schaden zu groß ist oder nicht repariert werden kann, wird die betreffende Zelle durch Apoptose eliminiert (172). An den Kontrollpunkten wird also entschieden, ob die Zelle im Zellzyklus voranschreitet, der Zellzyklus zur Reparatur unterbrochen wird, oder ob die Apoptose eingeleitet wird (172). Das Kontrollsystem des Zellzyklus basiert auf zwei Proteinfamilien, den Cdks (cyclin dependent protein kinases) und den Zyklinen (170, 172). Die Cdks erlauben ein Voranschreiten durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus, indem sie Substrate phosphorylieren (170, 172). Ihre Kinase-Aktivität ist vom Vorhandensein aktivierender Untereinheiten, den Zyklinen, abhängig (172). Je nachdem, ob die Zykline während einer Phase des Zellzyklus gebraucht werden oder nicht, variiert ihre Menge (170, 172). Die Cdks können aber nicht nur aktiviert, sondern auch gehemmt werden (172). Die Zyklin/Cdk-Komplexe können von Cdk-Inhibitor (CKI)-Proteinen gebunden werden, die die Kinase-Aktivität inhibieren und ein Voranschreiten des Zellzyklus verhindern (172, 177).

p53 ist ein Tumorsuppressor (12), normalerweise liegt es in der Zelle in niedriger Konzentration vor (178). Wie viel p53 in den Zellen vorliegt, wird weniger davon bestimmt,

wie viel gebildet wird, als vielmehr davon, wie viel abgebaut wird (179). p53 wird durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut (179). Zur Ubiquitilierung sind drei Enzyme (E1-E3) notwendig (13). Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch eine kovalente Thioesterbindung an das E1-Enzym (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) aktiviert (13). Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym), wieder in Form einer energiereichen Thioesterbindung, übertragen (13). Zum Schluss wird durch E3 (Ubiquitin-Protein-Ligase) das aktivierte Ubiquitin auf das Substrat übertragen (13). Ubiquitin wird mehrfach an das Substrat angehängt (179). Durch die so entstehende Ubiquitin-Kette kann p53 vom 26-S-Proteasom im Zytoplasma erkannt werden, wo es proteolytisch abgebaut wird (16, 179). Unter normalen Bedingungen wird p53 eng durch MDM2 (murine double minute 2), das an p53 bindet und als Ubiquitin-Protein-Ligase agiert, über eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife kontrolliert (12, 16, 18). Das sieht wie folgt aus: Das Protein p53 bindet an die regulatorische Region des MDM2-Gens und stimuliert die Transkription dieses Gens zu mRNA, die dann in Proteine übersetzt wird (179). Das MDM2-Protein bindet an p53 und agiert als Ubiquitin-Protein-Ligase (16, 18), wodurch p53 abgebaut wird. Dadurch nimmt die Konzentration von p53 ab, wodurch auch die Transkription des MDM2-Gens reduziert wird, dadurch steigt der p53-Spiegel wieder und der Kreislauf beginnt erneut (179). p53 ist ein Tumorsuppressor (12), d.h. im Fall von DNA-Schäden oder anderen Arten von Stress wie Hitzeschock oder Hypoxie, ist p53 dafür verantwortlich, entweder das Voranschreiten des Zellzyklus zu unterbrechen, indem es zu einem Zell-Zyklus-Arrest in der G1-Phase führt (13, 14), DNA-Reparatur-Mechanismen zu aktivieren (15), oder die Apoptose, den programmierten Zelltod, einzuleiten (12, 16, 17). Unter diesen Umständen darf p53 nicht wie üblich proteolytisch abgebaut werden (14). Der Zellzyklus wird unterbrochen, indem p53 direkt die Expression des CDK-Inhibitorproteins p21 stimuliert (179). Außerdem bindet p53 an die regulatorische Region des BAX-Gens, das BAX-Protein induziert die Apoptose (179). Welche Proteine die abnormale DNA-Struktur erkennen, ist noch unklar, mögliche Kandidaten sind die Proteine Rad1, Rad9 und Hus1, die in ihrer Struktur PCNA ähneln (180). Es wird diskutiert, ob sie wie PCNA ein Heterodimer bilden, das dann auf die beschädigte DNA gepackt wird (180). Rad17, das strukturell dem Replikationsfaktor C (RFC) ähnelt, ist ebenfalls ein möglicher Sensor (180). Im Gegensatz zu den Sensoren weiß man über die Signalüberträger mehr (180). ATM und ATR, die zur PI3K-Familie gehören, sind Hauptüberträger eines DNA-Schadens (17). Tritt ein DNA-Schaden auf, wird p53 posttranslational an Position Ser-15 und Ser-21 von der ATM-Kinase und der CHK2-Kinase phosphoryliert (17). Auch Mitglieder der MAPK-Familie phosphorylieren p53

(17). Wenn p53 phosphoryliert ist, kann es nicht mehr mit MDM2 interagieren, es wird dann stabilisiert und nicht abgebaut (179). Mehr als die Hälfte aller menschlichen Tumore weist eine Mutation/Deletion des TP53 Gens auf, die je nach Tumortyp- und Stadium zwischen 5 und 80% liegt (181). Die von dem hier verwendeten Antikörper detektierte Mutation besteht in einem Austausch an Position 20 (S zu D). Durch diese Mutation wird die Phosphorylierungsstelle beseitigt (persönliche Kommunikation mit Abcam).

Ein weiteres Tumorsuppressor-Protein ist das Retinoblastomprotein (pRb) (20-23), das zusammen mit p107 und p130 die Familie der „Taschen-Protein“ („pocket proteins“) bildet, wobei nur pRb Tumor-Suppressor-Eigenschaften besitzt (182). pRb verhindert das Voranschreiten von der G1-Phase zur S-Phase (21-23, 183, 184), indem es den Transkriptionsfaktor E2F bindet und dadurch inaktiviert (184-186). E2Fs agieren als Heterodimere, die aus einem Komplex aus einem E2F-Protein und einem DP-Bindungspartner bestehen (182). Bisher wurden 6 E2F-Proteine und 3 DP-Proteine beschrieben (187). E2F kann allerdings nur von der hypophosphorylierten Form des pRb gebunden werden (20, 23, 188). Der Phosphorylierungsgrad von pRb ändert sich im Laufe des Zellzyklus (189-192). Während der G0- und der frühen G1-Phase liegt das Retinoblastomprotein in seiner aktiven, hypophosphorylierten Form vor und unterdrückt somit die Aktivität von E2F (20, 22, 183). Im weiteren Verlauf der G1-Phase wird pRb jedoch hyperphosphoryliert und bleibt dies auch bis zum späten Zeitpunkt der Mitose-Phase (20). Am G1/S-Übergang ist der hyperphosphorylierte Zustand erreicht (182). Die Phosphorylierung von pRb erfolgt durch Zyklin-abhängige Kinasen (Cdks, Cyclin dependent Kinases) (184), die durch mitogene Stimuli aktiviert werden (183, 193). Zuerst wird pRb von ZyklinD/CDK4-, oder ZyklinD/CDK6-Komplexen, später von ZyklinE/CDK2-, oder ZyklinA/CDK2-Komplexen phosphoryliert (183). Da E2F nur von der hypophosphorylierten Form gebunden werden kann (20, 23, 188), ist E2F nun nicht mehr an Rb gebunden und aktiviert die Transkription von Genen, die für die S-Phase notwendig sind (22, 182, 193, 194). So kodieren Zielgene von E2F z.B. für die DNA-Polymerase  $\alpha$  (184). Das Retinoblastomprotein reguliert die Genexpression durch E2F auf zwei verschiedene Arten: zum einen bindet es E2F direkt und hemmt dadurch dessen transkriptionshemmende Wirkung, zum anderen rekrutiert es transkriptionshemmende Komplexe zu den Promotoren, die E2F-Bindungsstellen beinhalten (182). Die Bindung der Komplexe aus Retinoblastomprotein und HDAC (Histondeacetylase) (195) an E2F führt durch Deacetylierung zu einer Umstrukturierung der Chromatin-Struktur der von E2F regulierten Promotoren, die dadurch weniger zugänglich für ihre Transkriptionsfaktoren sind (182).

Da p16 die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, die den G1-Kontrollpunkt regulieren, inhibiert, wird es auch Ink4 (inhibitor of cdk4 (and 6)) genannt und kann als Tumorsuppressorprotein bezeichnet werden (27, 196-198). Die Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinases, CDKs) phosphorylieren pRb, was zu einer Konformitätsänderung und dadurch zur Freisetzung von E2F von pRb führt (27). Indem p16 an CDK4 und CDK6 bindet, verhindert es die Bindung von CDK4 und CDK6 an ZyklinD und die darauf folgende Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb (199). Folglich hat p16 im normalen Zellzyklus eine antiproliferative Wirkung (25). pRb und p16 bilden eine regulatorische Rückkopplungsschleife (regulatory feedback loop): durch die Phosphorylierung von pRb durch ZyklinD/CDK4 oder ZyklinD/CDK6 wird ein Transkriptionsfaktor (z.B. E2F-1), der in seiner an hypophosphoryliertes pRb gebundenen Form inaktiviert ist, freigesetzt (200). Durch die Dissoziation des Komplexes aus pRb und Transkriptionsfaktor wird die Transkription von p16 aktiviert (200). Dadurch steigt das Level an p16-mRNA, wodurch vermehrt p16 an CDK4 und CDK6 bindet, wodurch wiederum die ZyklinD/CDK4- und ZyklinD/CDK6-Kinaseaktivität inhibiert wird (200). Letztendlich nimmt die Phosphorylierung von pRb, sowie die p16-Expression ab (200). Abbildung 26 stellt den feedback loop graphisch dar.

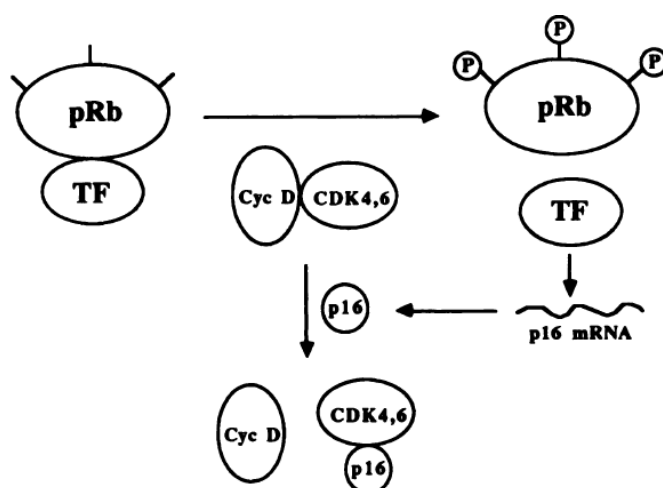


Abbildung 26 (200): Regulatorische Rückkopplungsschleife

*TF: transcription factor (Transkriptionsfaktor), Cyc D: cyclin D (ZyklinD)*

Sakaguchi et al wiesen immunhistochemisch eine inverse Korrelation zwischen p16 und pRb anhand von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC: non-small cell lung cancer) nach (201). Auch anhand von Krebszelllinien konnte gezeigt werden, dass zwischen der Expression von p16 und dem Vorhandensein von normalem pRb ein umgekehrter Zusammenhang besteht; so ist p16 nachweisbar, wenn pRb mutiert, entfernt oder inaktiviert ist, aber in Zelllinien mit normalem pRb, deutlich reduziert oder nicht vorhanden (26, 200, 202-206). Shapiro et al zeigten 1995, dass pRb-positive nicht-kleinzellige Lungenkarzinome kein oder wenig p16 exprimieren, wohingegen pRb-negative NSCLC und kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC: small cell lung cancer) viel p16 exprimieren (207). Khleif et al zeigten 1996, dass das p16-Protein in humanen Zervix-Karzinom-Zellen, die entweder eine mutierte Form des Retinoblastomgens oder aber die Wildtyp-Form, die funktionell durch E7 inaktiviert wurde, exprimiert wird (26). Außerdem kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Inaktivierung von pRb mit einer Hochregulierung von p16 korreliert (26). Klaes et al kamen 2001 zu denselben Resultaten (28). Sie beobachteten eine deutliche Überexpression von p16 bei allen CIN I-Läsionen (außer bei den Läsionen mit low-risk-HPV), allen CIN II-Läsionen, allen CIN III-Läsionen und fast allen invasiven Zervix-Karzinomen (28). Im Unterschied dazu konnte bei normalem Zervixepithel, entzündlichen Läsionen und CIN I-Läsionen mit low-risk-HPV, keine nennenswerte Expression von p16 beobachtet werden (28). Die durch die von E7 verursachte Inaktivierung von pRb und die daraus resultierende Überexpression von p16 kann also als spezifischer und sensitiver Biomarker für Zellen mit aktiver Expression von HPV-Onkogenen herangezogen werden (28). Somit kann die immunhistochemische Färbung mit p16 als nützlicher diagnostischer Marker bei zervikalen neoplastischen Läsionen in der pathologischen Routine-Diagnostik herangezogen werden (39).

E6-Proteine sind kleine Polypeptide aus ungefähr 150 Aminosäuren (208-210). Das charakteristische Kennzeichen der HPV E6-Proteine ist das Vorhandensein von vier Cys-X-X-Cys-Motiven, die sich zu zwei Zinkfingern zusammenlagern können (209-212).

Es konnte gezeigt werden, dass das E6-Protein von HPV 16 und HPV 18 in der Lage ist, an p53 zu binden (9, 10) und dass dadurch der Abbau von p53 durch das Ubiquitin-abhängige Proteasesystem stimuliert wird (11). Der Ubiquitin-vermittelte Abbau von Proteinen umfasst mehrere Schritte: Das Enzym E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym, ubiquitin-activating enzyme) aktiviert Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion, indem eine Thioesterbindung zwischen einem spezifischen Cystein des E1-Enzyms und dem Carboxy-Terminus des Ubiquitins gebildet wird (150). Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf einen Cystein-Rest des E2-Enzyms (Ubiquitin-konjugierendes Enzym, ubiquitin-conjugating enzyme) übertragen

(150), wobei die Thioesterbindung erhalten bleibt (213). E2 vermittelt die Übertragung des Ubiquitins von E1 auf das Protein-Substrat, mit oder ohne die Beteiligung von E3 (Ubiquitin-Protein-Ligase, ubiquitin protein ligase) (214). E3 unterstützt das Hinzufügen vieler Ubiquitin-Moleküle auf das Substrat (214). In manchen Fällen ist E3 zur Substraterkennung notwendig (215). Ubiquitin wird mehrfach aneinander gehängt, wodurch eine Ubiquitinkette entsteht, das mehrfach ubiquitinylierte Substrat wird dann vom 26S-Proteasom abgebaut (13). Bei der genaueren Untersuchung des Komplexes aus p53 und E6 stellte sich heraus, dass die Bindung von E6 an p53 durch einen zellulären Kofaktor, E6-AP (E6-associated protein, E6-assoziiertes Protein) vermittelt wird (148, 149, 151, 216). E6 bindet an E6-AP, der entstehende Komplex fungiert als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (150, 151). Außerdem führt E6 zum Abbau des Bak-Proteins, wodurch die Bak-induzierte Apoptose inhibiert wird (217-219). E6 wirkt antiapoptotisch indem es zum Abbau von FADD (Fas-associated death-domain, Fas-assoziierte Todes-Domäne) führt (219, 220). Eine weitere Funktion von E6 besteht in der Aktivierung der Telomerase, wodurch der sich mit jeder Zellteilung verkürzenden Länge der Telomere und der daraus resultierenden Seneszenz entgegengewirkt wird (221-224).

E7-Proteine setzen sich aus ungefähr 100 Aminosäuren zusammen (163, 225). Sie besitzen zwei Cys-X-X-Cys-Motive, die sich zu einem Zinkfinger zusammensetzen können (163, 210, 226). E7 interagiert mit dem Retinoblastomprotein (pRb) (227). Die Bindung von E7 an pRb führt dazu, dass E2F nicht mehr von pRb gebunden werden kann, also jetzt in seiner freien, aktiven Form vorliegt (227-230). Außerdem führt das E7-Protein zum Abbau von pRb über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (19). Durch die Inaktivierung des Retinoblastomproteins durch E7 kommt es zu einer Überexpression von p16 (25, 26). Daher dient der immunhistologische Nachweis von p16 als Marker für HPV-assoziierte dysplastische und maligne zervikale Läsionen (27, 28). Eine weitere Funktion des E7-Proteins ist es, die Zellzyklusinhibitor-Proteine p21 und p27 zu binden und dadurch zu inaktivieren (231-235). E7 bildet Komplexe sowohl mit ZyklinA, als auch mit ZyklinE und führt dadurch zu zellulärer Hyperpoliferation (236). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von E7 zur Expression der ZyklinE- und ZyklinA-Gene führt (237).

Galektine, früher bekannt als S-Typ oder S-Lac-Lektine, werden neben den C-Typ-Lektinen, den P-Typ-Lektinen und den Pentraxinen den Lektinen zugeordnet (238). Sie binden  $\beta$ -Galaktoside mittels ihrer Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (carbohydrate recognition domain, CRD), die ungefähr 130 Aminosäuren umfasst und allen Galektinen gemeinsam ist (29, 239, 240). Mitglieder der Galektin-Familie müssen zwei Kriterien erfüllen: Affinität zu

$\beta$ -Galaktosiden und signifikante Gemeinsamkeiten die Aminosäuresequenz der Kohlenhydrat-Bindungsstelle betreffend (241). Bisher wurden 15 Galektine bei Säugetieren identifiziert (29). Beim Menschen wurden nur 12 Galektin-Gene gefunden, 2 für Galektin-9 (242). Man unterteilt die Galektine je nach der Anzahl ihrer CRDs in 3 Gruppen (29, 242):

1. Galektin 1, 2, 7, 10, 13, 14: Prototyp-Galektine (prototypical galectins): enthalten eine CRD, die Homodimere bilden kann
2. Galektin 4, 8, 9, 12: Galektine vom tandem-repeat-Typ (tandem-repeat galectins): enthalten zwei CRDs, die durch ein Bindeglied aus 5-50 Aminosäuren miteinander verbunden sind
3. Galektin 3: Galektin vom chimären Typ (chimeric galectin): enthält eine CRD, die an eine circa 120 Aminosäuren lange, an Prolin, Glyzin und Tyrosin reiche Polypeptidkette gebunden ist.

Andere Bezeichnungen für Galektin-3 sind CBP35, Mac2, L-29, L-34, IgEBP und LBP (243). Galektin-3 induziert die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Laminin und Fibronectin und ist somit an der Basalmembran-Passage der neutrophilen Granulozyten an Entzündungsstellen beteiligt (244). Außerdem wirkt Galektin-3 als Lockstoff für Monozyten und Makrophagen (245) und induziert die Morphogenese und Angiogenese von Endothelzellen (246). Desweiteren wird Galektin-3 in durch IL-4 aktivierten B-Zellen exprimiert und vermittelt den Effekt von IL-4 auf das Schicksal der B-Zellen, so führt die Blockierung von intrazellulärem Galektin-3 zur Aufhebung des IL-4 induzierten Überlebens aktivierter B-Zellen, wodurch die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen begünstigt wird (247). Galektin-3 spielt auch eine Rolle bei der Tumorgenese. So vermittelt es die neoplastische Transformation durch Interaktion mit Ras-Onkogenen (29), Galektin-3 interagiert mit aktiviertem K-Ras, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von PI3-K und Raf-1 durch K-Ras führt (248). Außerdem beeinflusst Galektin-3 den Zellzyklus: es stimuliert ZyklinD, p27, p21 und hemmt ZyklinE und ZyklinA (29). Eine weitere Funktion von Galektin-3 ist die Regulierung der Tumor-Zell-Apoptose, abhängig von der Lokalisation in der Tumorzelle: zytoplasmatisches gal-3 wirkt antiapoptotisch, begünstigt also die Tumor-Progression, wohingegen nukleäres gal-3 pro-apoptotisch, also gegen den Tumor wirkt (29, 249). Dadurch, dass die Stimulierung der Expression von ZyklinD1 und c-Myc durch  $\beta$ -Cathenin von gal-3 abhängig ist, ist gal-3 auch am Wnt-Signalweg beteiligt: gal-3 bindet an  $\beta$ -Cathenin, der entstandene Komplex regt die transkriptionelle Aktivität von Tcf an, ZyklinD1 und c-Myc werden exprimiert (250). Galektin-3 ist auch an der Tumormetastasierung beteiligt, indem es die Angiogenese induziert, an  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Integrin bindet und deren

Expression hochreguliert (29-31). Darüberhinaus beeinflusst Galektin-3 die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort: Gal-3 induziert die T-Zell-Apoptose und schränkt die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion durch Bildung von Komplexen mit auf dem T-Zell-Rezeptor vorhandenen Glykanen ein (29, 32, 33).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Paraffinschnitten von Zervixkarzinomen immunhistochemisch die Expression von E6, p53, einer mutierte Form von p53, p16, MDM2 und Galektin-3 untersucht und diese in Beziehung zu verschiedenen Parametern wie T-Status, FIGO-Stadium und histologischer Subtyp des Karzinoms gesetzt. Außerdem wurde untersucht, ob die vermehrte Expression eines Proteins einen Überlebensvorteil bedeutet und ob die Expressionen der verschiedenen Proteine untereinander positiv beziehungsweise negativ korrelieren. Ursprünglich sollte das E7-Onkoprotein ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Allerdings musste darauf letztendlich verzichtet werden, da zwar ein immunhistochemisches Färbeprotokoll für den E7-Antikörper der Firma Chemicon (Nr. MAB 8680, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erarbeitet werden konnte, welches zu spezifischen Färbeergebnissen führte, aber die Produktion des betreffenden Antikörpers eingestellt wurde und kein adäquater Ersatz gefunden werden konnte. Alle anderen getesteten E7-Antikörper führten zu inakzeptablen Färbeergebnissen.

Es zeigte sich, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Expression des E6-Onkoproteins und dem T-Status besteht. Je höher der T-Status war, desto mehr wurde E6 exprimiert. Eine positive Korrelation zeigte sich auch zwischen der zytoplasmatischen E6-Expression und der FIGO-Klassifikation, d.h. bei höherem FIGO-Stadium wurde auch E6 stärker exprimiert. Außerdem stellte sich heraus, dass Adenokarzinome E6 (im Zytoplasma) stärker exprimierten als Plattenepithelkarzinome (im Zytoplasma).

Bei der Expression von p53 verhielt es sich gegensätzlich: Plattenepithelkarzinome zeigten die stärkere Expression von p53 (im Kern) als Adenokarzinome (im Kern). Genauso verhielt es sich bei der zytoplasmatischen Expression von p53.

Bezüglich der mutierten Form von p53 konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der nukleären Expression und dem Überleben der Patientinnen besteht: wird die mutierte Form von p53 im Kern exprimiert, so haben diese Patientinnen einen Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen, die keine nukleäre Expression im Karzinom zeigen. Allerdings beeinflusst nur die nukleäre Expression der mutierten Form von p53 das Überleben, die zytoplasmatische Expression bedeutet keinen Überlebensvorteil. Die Patientinnen, deren Karzinome in dieser Arbeit untersucht wurden, erhielten eine



Bestrahlungstherapie; daher liegt die Vermutung nahe, dass die Mutation von p53 das Ansprechen auf die Therapie positiv beeinflusst. Tatsächlich zeigten Okaichi et al, dass unterschiedliche Mutationen von p53 die Radiosensitivität beeinflussen (251).

Darüberhinaus waren die Unterschiede zwischen der Expression der mutierten Form von p53 im Kern beim Adeno-und Plattenepithelkarzinom signifikant, auch wenn die mittlere Expression für beide Karzinomtypen 0 war. Plattenepithelkarzinome exprimierten die mutierte Form von p53 im Kern stärker als Adenokarzinome.

Außerdem zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation zwischen E6 und der mutierten Form von p53. Entsprechend wiesen Zervixkarzinome mit niedriger Expression des E6-Onkoproteins im Zytoplasma eine hohe Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma auf, sowie Fälle mit starker E6-Expression im Zytoplasma, eine sehr niedrige Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma aufwiesen.

E6 bindet an p53 (9) und stimuliert dadurch den Abbau von p53 durch das Ubiquitin-abhängige Proteasesystem (11). Es ist meiner Meinung nach möglich, dass E6 auch die mutierte Version von p53 abbauen könnte. Mutationen von p53 treten sehr häufig bei Karzinomerkkrankungen auf (179, 252, 253). Mehr als die Hälfte aller menschlichen Tumore weist eine Mutation/Deletion des TP53 Gens auf, die je nach Tumortyp-und Stadium zwischen 5 und 80% liegt (181). Eine Metaanalyse, der 49 Veröffentlichungen zugrundeliegen, konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer sehr häufigen Mutation und der Anfälligkeit für das Zervixkarzinom ziehen (254). Allerdings konnte dieselbe Mutation mit einem erhöhten Risiko für das Pankreas-Karzinom bei Männern in Zusammenhang gebracht werden (255), aber scheint einen protektiven Effekt gegenüber Brustkrebs bei arabischen Frauen zu haben (256). Die von dem hier verwendeten Antikörper detektierte Mutation besteht in einem Austausch an Position 20 (S zu D). Durch diese Mutation wird die Phosphorylierungsstelle beseitigt (persönliche Kommunikation mit Abcam). Im Falle eines DNA-Schadens wird durch die Phosphorylierung dieses Serins die Interaktion von p53 mit MDM2 abgeschwächt, woraus eine Stabilisierung von p53 resultiert (257-259). Die Mutation verhindert also einen Anstieg des p53-Levels nach DNA-Schäden, was normalerweise der Fall wäre.

Auch für die p16-Expression zeigte sich ein Unterschied zwischen Plattenepithel-und Adenokarzinom. Für Plattenepithelkarzinome lag der mittlere IRS für die zytoplasmatische Expression bei 6, für Adenokarzinome bei 4.

Was die Expression von MDM2 und Galektin-3 betrifft, so ergab sich zwischen beiden eine signifikante, positive Korrelation: Zervixkarzinome mit niedriger MDM2-Expression zeigten

auch eine niedrige Galektin-3-Expression, genauso wie Fälle mit einer hohen MDM2-Expression auch eine hohe Galektin-3-Expression aufwiesen.

In Bezug auf Galektin-3 stellte sich heraus, dass bei Patientinnen, die kein oder nur wenig p16 exprimierten, die Expression von Galektin-3 mit einer schlechten Prognose in Verbindung steht. Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen steht, was Lee et al publizierten (260). Lee et al untersuchten, ob die Galektin-3-Expression mit der Progression zervikaler Neoplasien in Zusammenhang gesetzt werden kann (260). Tatsächlich zeigte sich, dass die immunhistochemische Expression von Galektin-3 in normalem Plattenepithel der Zervix stark war und mit zunehmendem Dysplasie-Grad kontinuierlich abnahm, d.h. starke Expression in normalem Plattenepithel, mäßige Expression bei LSIL (low grade squamous intraepithelial lesion), schwache Expression bei HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion) und keine Expression beim invasiven Karzinom (260). Auch mittels quantitativer Echtzeit-PCR kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Galektin-3-m-RNA-Expression beim invasiven Plattenepithelkarzinom der Zervix im Vergleich zu der bei gesundem Zervixgewebe niedriger war (260). Kim (261) et al kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen wie Lee et al (260): eine Expression von mehr als 50% von Galektin-3 wurde bei 5% des normalen Zervixgewebes, bei 23,5% der LSILs (low grade squamous intraepithelial lesions) und bei 70-80% der HSILs (high grade squamous intraepithelial lesions) und der invasiven Karzinome beobachtet (261). Punt et al untersuchten die Expression von Galektin-1, -3 und -9 beim Plattenepithelkarzinom der Zervix (262): eine starke Expression von Galektin-1 bedeutete schlechtes Überleben und könnte daher als Marker für eine aggressivere Krebstherapie verwendet werden (262). Galektin-3 könnte 2 Funktionen haben, da die starke Expression mit geringerer Tumordinvasionstiefe korrelierte, wohingegen eine schwache Expression mit einer größeren Tumordinvasionstiefe korrelierte (262). Zhou et al (263) kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie ich. Sie untersuchten die Zervixkarzinome von 174 Patientinnen mit FIGO-Stadium I/II (263). 94 von 174 (54,0%) Zervixkarzinomgeweben zeigten eine Expression von Galektin-3 (263). Die Tumorremissionsrate nach präoperativer Bestrahlung war bei Patientinnen mit hochreguliertem Galektin-3 mit 39,7% niedriger als bei Patientinnen mit runterregulierter oder unveränderter Galektin-3-Expression (70%) (263). Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich Folgendes: die Patientinnen überlebten schlechter, lag FIGO-Stadium II oder I vor, war das Karzinom bereits in den Lymph- bzw. Gefäßraum vorgedrungen (verglichen mit Patientinnen, bei denen dieser Bereich noch tumorfrei war), hatte das Karzinom bereits das Parametrium befallen (verglichen mit Patientinnen mit noch tumorfreiem Parametrium), fand man Lymphknotenmetastasen statt metastasenfreier Lymphknoten und waren die Karzinome

positiv für Galektin-3 statt negativ (263). Zhou et al gelangten zu der Schlussfolgerung, dass die positive Expression von Galektin-3 ein prädiktiver Faktor für Metastasen in den Beckenlymphknoten und für ein schlechteres Gesamtüberleben bei Zervixkarzinompatientinnen ist (263). Als mögliche Erklärung kommt für Zhou et al ein eventuelles Nichtansprechen auf die Bestrahlungstherapie bei hochregulierter Galektin-3-Expression in Frage (263). Wang et al untersuchten anhand der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, welchen Einfluss Galektin-3 auf natürliche Killerzellen (NK cells, natural killer cells) hat (264). Es zeigte sich, dass die genetische Runterregulierung von Galektin-3 in HeLa-Tumorzellen dazu führte, dass die HeLa-Zellen empfänglicher für die Lyse durch die natürlichen Killerzellen wurden, wohingegen HeLa-Zellen, die Galektin-3 überexprimierten, weniger auf natürliche Killerzellen ansprachen (264). Sie schlussfolgerten daraus, dass das vom Tumor freigesetzte Galektin-3 die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den natürlichen Killerzellen verringern könnte, indem es an NKp30 bindet, wodurch die Bindung von NKp30 an seine Liganden auf den Tumorzellen gestört wird (264). Dadurch wird die NKp30-vermittelte Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen inhibiert, der Tumor umgeht also die Immunabwehr (264). Das macht die Interaktion zwischen Galektin-3 und den natürlichen Killerzellen zu einem möglichen Ansatzpunkt neuer Therapien (264). Liu et al beobachteten, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor C (vascular endothelial growth factor c, VEGF-C) die Invasivität von Zervixkarzinomzellen durch Hochregulierung von Galektin-3 steigerte (265).

## 7. Schlussfolgerung

Meine Untersuchungen zeigten, dass größere Tumore der Zervix auch stärker E6 exprimierten (je höher der T-Status und das FIGO-Stadium, desto stärker wurde E6-Onkoprotein im Zytoplasma exprimiert). Außerdem exprimierten Adeno- und Plattenepithelkarzinome E6 nicht in gleichem Maß, Adenokarzinome zeigten im Zytoplasma eine stärkere Expression als Plattenepithelkarzinome. Bei der Expression von p53 verhielt es sich gegensätzlich. Interessant war die Beobachtung, dass Patientinnen, deren Karzinome die mutierte Form von p53 im Kern exprimierten, einen Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen ohne die nukleäre Expression hatten. Dies macht es möglich, Patientinnen mit schlechterer Prognose zu erkennen und gezielter zu behandeln. Plattenepithelkarzinome zeigten mehr Expression der mutierten Form von p53 als Adenokarzinome. Daraus, dass eine signifikante, negative Korrelation zwischen E6 und der mutierten Form von p53 besteht, kann geschlussfolgert werden, dass es E6 möglich sein könnte, auch die mutierte Version von p53 abzubauen. Desweiteren zeigte sich zwischen den Expressionen von MDM2 und Galektin-3 eine signifikante, positive Korrelation. Bezüglich gal-3 zeigte sich, dass dessen Expression bei Patientinnen, die kein oder nur wenig p16 exprimierten, in Zusammenhang mit einer schlechten Überlebensprognose steht. Dies könnte für die Behandlung von Patientinnen mit wenig bzw. niedriger p16-Expression interessant sein. Mit Hilfe der von mir erarbeiteten immunhistochemischen Färbung von Zervixkarzinomen mit dem E6-Antikörper der Firma Abcam, lässt sich HPV sehr einfach nachweisen. HPV-Infektionen der Zervix werden durch Polymerasekettenreaktionen (PCR) oder in-situ-Hybridisierung nachgewiesen (34-38). Eine weitere, jedoch indirekte Methode, ist die p16-Immunhistochemie (27, 28, 36, 39). Befolgt man das von mir erarbeitete immunhistochemische Färbeprotokoll für den E6-Antikörper von Abcam (Cambridge, UK), so erhält man spezifische Färbungen, die Aussagen über die Expression des E6-Onkoproteins treffen lassen.

Ich bin der Ansicht, dass der Nachweis von HPV durch immunhistochemische Färbung mit dem E6-Antikörper von Abcam gemäß meines Protokolls kostengünstiger und einfacher durchzuführen ist als durch Polymerasekettenreaktion oder die in-situ Hybridisierung.

## 8. Verzeichnis der Abkürzungen, Akronyme und Symbole

ABC-Methode:	(Strept) Avidin-Biotin-Complex-Methode
AG:	Aktiengesellschaft
AIS:	adenocarcinoma in situ, Adenkarzinom in situ
AK:	Antikörper
Aqua dest.:	aqua destillata, destilliertes Wasser
ATM:	ataxia-telangiectasia mutant
ATR:	ataxia-telangiectasia and Rad3
BAX:	BCL 2 Associated X Protein, BCL 2-assoziiertes X-Protein
bzw.:	beziehungsweise
bp:	base pair, Basenpaar
CA:	Kalifornien, Bundesstaat der Vereinigten Staaten von Amerika
ca.:	circa
cand:	candidate, Kandidat
CBP35:	carbohydrate binding protein 35
CDK2:	cyclin dependent kinase 2, Zyklin-abhängige Kinase 2
CDK4:	cyclin dependent kinase 4, Zyklin-abhängige Kinase 4
CDK6:	cyclin dependent kinase 6, Zyklin-abhängige Kinase 6
Cdks:	cyclin dependent protein kinases, Zyklin-abhängige Protein Kinasen
CGIN:	cervical glandular intraepithelial Neoplasia, zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie
CHK2:	checkpoint kinase 2
CIN:	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIN I:	zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad I, leichte Dysplasie, höchstes Maß der Differenzierung
CIN II:	zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad II, mittelschwere Dysplasie, weniger differenziert als CIN I
CIN III:	zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad III, schwere Dysplasie und carcinoma in situ, Geringstes Maß der Differenzierung
CKI:	cyclin dependent protein kinase inhibitor protein, CDK-Inhibitor-Protein
cm:	Zentimeter
CRD:	carbohydrate recognition domaine, Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne
CTL:	cytotoxic t-cell, zytotoxische T-Zelle
Cyc D	cyclin D, ZyklinD
Cys:	Cystein
D:	Asparaginsäure
DAB:	3,3 Diaminobenzidin
DC:	dendritic cells, dendritische Zellen
d.h./D.h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DP-Protein:	DNA-binding protein, DNA-bindendes Protein
E (region):	early (region), frühe (Region) des Genoms der Humanen Papillomaviren
E1, E2, E4; E5, E6, E7:	early genes, frühe Gene der Humanen Papillomaviren
E1-Enzym:	ubiquitin-activating enzyme, Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2-Enzym:	ubiquitin-conjugating enzyme, Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3-Enzym:	ubiquitin protein ligase, Ubiquitin-Protein-Ligase
E6AP:	E6-associated protein, E6-assoziiertes Protein
E2F:	Transkriptionsfaktor E2F: E2-Promotor Binding Factor
EGD:	endocervical glandular dysplasia, endozervikale glanduläre Dyplasie
EV:	epidermodysplasia verruciformis
Fab-Stück:	antigenbindendes Stück des Antikörpers
FADD	Fas-associated death domain, Fas-assoziierte Todes-Domäne
Fc-Stück:	konstantes Stück des Antikörpers, c steht für englisch constant, deutsch konstant
FDA:	U.S. Food and Drug Administration
FIGO:	von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique vorgeschlagenes System zur Einteilung gynäkologischer Tumore
FIGO1:	Stadium 1 der FIGO-Klassifikation, Tumor begrenzt auf Zervix
FIGO2:	Stadium 2 der FIGO-Klassifikation, Tumor infiltriert jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
FIGO3:	Stadium 3 der FIGO-Klassifikation, Tumor breitet sich bis zur Beckenwand aus und/oder befällt das untere Drittel der Vagina und/oder verursacht Hydronephrose oder eine stumme Niere
FIGO4:	Stadium 4 der FIGO-Klassifikation, Tumor infiltriert die Schleimhaut von Blase oder Rektum oder überschreitet die Grenze des kleinen Beckens
g:	Gramm
gal-3:	Galektin-3
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co.KG:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Compagnie Kommanditgesellschaft
G0-Phase:	Ruhephase im Zellzyklus
G1-Phase:	erste Lücken (englisch gap) - Phase im Zellzyklus
G2-Phase:	zweite Lücken (englisch gap) - Phase im Zellzyklus
h:	Stunde(n)

HCGIN:	high grade cervical glandular intraepithelial neoplasia, zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie hohen Grades
HDAC:	Histondeacetylase
HeLa (Tumorzellen):	Tumorzellen, die von den Zervixkarzinomzellen der Henrietta Lacks a stammen. Sie wurde am 9.2.1951 am Johns Hopkins Krankenhaus in Baltimore aufgrund ihres Zervixkarzinoms operiert, wobei ohne ihr Wissen Zervixkarzinomzellen entnommen und an die Forschung weitergegeben wurden. Es sind die ersten menschlichen Zellen aus denen eine permanente Zelllinie entstand.
HIV:	human immunodeficiency virus, Humanes Immundefizienz Virus
H-Ketten:	von englisch heavy (schwer), lange, schwere Ketten des Antikörpers
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Wasserstoffperoxid
HPV:	Humaner Papillomavirus/ Humane Papillomaviren
HPV-1, HPV-2:	HPV-Typ1, HPV-Typ2
HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31, HPV 33:	HPV-Typ 16, 18, 45, 31, 33
HPV 52, HPV 58, HPV 35, HPV 59, HPV 56:	HPV-Typ 52, 58, 35, 59, 56
HPV 39, HPV 51, HPV 73, HPV 68, HPV 66:	HPV-Typ 39, 51, 73, 68, 66
HP-Viren:	Humane Papillomaviren
HPV-positiv:	positiv für Humane Papillomaviren
HRP:	Horse Radish Peroxidase
HSILs:	high grade squamous intraepithelial lesions, Intraepitheliale Läsionen des Plattenepithels hohen Grades
IARC:	International Agency for Research on Cancer, Internationale Agentur für Krebsforschung
ICTV:	International Committee on the Taxonomy of Viruses, Internationales Komitee der Taxonomie der Viren
IgA:	Immunglobulin der Klasse A
IgD:	Immunglobulin der Klasse D
IgE:	Immunglobulin der Klasse E
IgG:	Immunglobulin der Klasse G
IgG1:	Immunglobulin der Klasse G1
IgG2a:	Immunglobulin der Klasse G2a
IgEBP:	IgE binding protein
IgM:	Immunglobulin der Klasse M
L-29:	Lectin-29
L-34:	Lectin-34
IL4:	Interleukin 4
IL-10:	Interleukin-10
IRS Score:	Immunrekativer Score
kb:	kilobase, Kilobase
KGaA:	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	Kaliumdihydrogenphosphat
K-Ras:	Kirsten Rat-Sarcoma
L (region):	late (region), späte (Region) des Genoms der Humanen Papillomaviren
l:	Liter
L1:	late gene, spätes Gen der Humanen Papillomaviren
L2:	late gene, spätes Gen der Humanen Papillomaviren
LBP:	laminin binding protein
LCGIN:	low grade cervical glandular intraepithelial neoplasia, zervikoglanduläre intraepitheliale Neoplasie niedrigen Grades
LCR:	long control region, lange Kontroll-Region des Genoms der Humanen Papillomaviren
L-Ketten:	von englisch light (leicht), kurze, leichte Ketten des Antikörpers
LSIL:	low grade squamous intraepithelial lesion, geringgradige intraepitheliale Läsion des Plattenepithels
0,1M: 0,1 molar	
Mac2:	macrophage cell-surface antigen 2
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MDM2:	murine double minute 2
mg:	Milligramm
min:	Minute(n)
ml:	Milliliter
mL:	Milliliter
MnPV:	Mastomys natalensis papillomavirus
M-Phase:	Mitose-Phase im Zellzyklus
m-RNA:	messenger-RNA, Boten-RNA
Na:	Natrium
NaCl:	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	Dinatriumhydrogenphosphat
ng:	Nanogramm
NK cells:	natural killer cells, natürliche Killerzellen
NKp30:	die natürlichen Killerzellen aktivierender Rezeptor, der sich auf ihrer Oberfläche befindet
nm:	Nanometer
NSCLC:	non-small cell lung cancer, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
p16:	Protein p16
p21:	Protein p21
p27:	Protein p27
p53:	Protein p53
p107:	Protein p107
p130:	Protein p130
PBS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

PCNA:	proliferating cell-nuclear antigen
PCR:	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
ph:	potential hydrogenii
PI3K:	phosphoinositide 3-kinase, Phosphoinositid-3-Kinase
pRB:	retinoblastoma protein, Retinoblastomprotein
PV:	Papillomaviren
Rad1:	Protein Rad1
Raf1:	rapidly accelerated fibrosarcoma 1 protein
Ras:	rat sarcoma protein
RFC:	Replikationsfaktor C
RNA:	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
S:	Serin
S.:	Seite
SCJ:	Squamocolumnar Junction, Stelle auf der Zervix, an der das Plattenepithel auf das Zylinderepithel trifft
SCLC:	small cell lung cancer, kleinzelliges Bronchialkarzinom
Ser-15:	serine-15
Ser-21:	serine-21
SIL:	squamous intraepithelial lesion, intraepitheliale Läsion des Plattenepithels, Präkanzerose des Plattenepithels
S-Phase:	Synthese-Phase im Zellzyklus
SPSS:	Statistic Package for Social Sciences
T1:	Stadium T1 der TNM-Klassifikation, Tumor begrenzt auf Zervix
T2:	Stadium T2 der TNM-Klassifikation, Tumor infiltriert jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
T3:	Stadium T3 der TNM-Klassifikation, Tumor breitet sich bis zu Beckenwand aus und/oder befällt das untere Drittel der Vagina und/oder verursacht Hydronephrose oder eine stumme Niere
TF	transcription factor, Transkriptionsfaktor
TGF-β1:	transforming growth factor β1
T-Status:	gibt Auskunft über die Tumorgroße bei der TNM-Klassifikation (N: Beteiligung der Lymphknoten, M: Vorhandensein von Metastasen)
TZ:	Transformationszone
µg:	Mikrogramm
UK:	United Kingdom, Vereinigtes Königreich
µm:	Mikrometer
USA:	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
usw.:	und so weiter
VEGF-C:	vascular endothelial growth factor c, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor C
WHO:	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
Wnt:	Signalprotein im Wnt-Signalweg zusammengesetzt aus englisch wingless und integrated 1 (int1)
z.B.:	zum Beispiel
%:	Prozent
<:	kleiner
>:	größer
≥:	größer gleich
≤:	kleiner gleich
=:	ist gleich
°C:	Grad Celsius
&:	und
+::	plus
@:	Registered Trademark
x:	mal



## 9. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization (WHO). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer 2015 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>].
2. Krebs in Deutschland 2009/2010, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin; 2013.
3. Arbyn M, Castellsague X, De Sanjose S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Annals of oncology*. 2011;22(12):2675-86.
4. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370:890-907.
5. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3):S4-S7.
6. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, Pan MH, You SL, Chuang LC, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(18):1387-96.
7. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20(54):7888-98.
8. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*. 2010;117(2):S5-S10.
9. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-9.
10. Zhao F, Huang W, Ousman T, Zhang B, Han Y, Clotaire DZJ, et al. Triptolide induces growth inhibition and apoptosis of human laryngocarcinoma cells by enhancing p53 activities and suppressing E6-mediated p53 degradation. *PloS one*. 2013;8(11):e80784.
11. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129-36.
12. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 2004;303(5659):844-8.
13. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer research*. 1996;56(11):2649-54.
14. Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Current opinion in genetics & development*. 1996;6(1):12-8.
15. Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(4):883-96.
16. Momand J, Wu H-H, Dasgupta G. MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 2000;242(1):15-29.
17. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(15):12710-7.
18. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*. 1997;420(1):25-7.
19. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer research*. 1996;56(20):4620-4.
20. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81(3):323-30.

21. Goodrich DW, Wang NP, Qian Y-W, Eva Y-HL, Lee W-H. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991;67(2):293-302.
22. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25(38):5220-7.
23. Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Ålin K, Luban J, et al. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*. 1994;79(1):119-30.
24. Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *Journal of virology*. 2001;75(16):7583-91.
25. Klussmann PDJ, Preuss S, Speel E. Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. *Hno*. 2009;57(2):113-22.
26. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(9):4350-4.
27. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *The American journal of pathology*. 1998;153(6):1741-8.
28. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International Journal of Cancer*. 2001;92(2):276-84.
29. Liu F-T, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(1):29-41.
30. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(3):788-91.
31. Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *International journal of cancer*. 2000;85(4):545-54.
32. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim H-RC, Hogan V, Inohara H, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer research*. 2003;63(23):8302-11.
33. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733-9.
34. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(1):1-17.
35. Schneider A, Dürst M, Jochmus I, Gissmann L. Epidemiologie, Ätiologie und Prävention des Zervixkarzinoms. *Der Gynäkologe*. 1999;32(4):247-60.
36. Assmann G, Sotlar K. [HPV-associated squamous cell carcinogenesis]. *Der Pathologe*. 2011;32(5):391-8.
37. Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*. 1992;189(1):132-40.
38. Evans MF, Peng Z, Clark KM, Adamson CS-C, Ma X-J, Wu X, et al. HPV E6/E7 RNA in situ hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier cervical intraepithelial neoplasia grade. *PloS one*. 2014;9(3):e91142.
39. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in

- cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology international*. 1998;48(8):580-5.
40. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*. 2010;127(12):2893-917.
  41. World Health Organization (WHO). *Comprehensive Cervical Cancer Control, A guide to essential practice*. 2014.
  42. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. 2 ed. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München; 2006.
  43. Pfleiderer A, Kaufmann M. *Anatomie, Topographie und Funktion der weiblichen Genitalorgane*. In: Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfleiderer A, editors. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5 ed: Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart; 2008.
  44. Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. 257 ed. Hamburg: Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg; 1994.
  45. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Prometheus, LernAtlas der Anatomie, Hals und Innere Organe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart; 2005.
  46. Ferenczy A, Wright TC. *Anatomy and histology of the cervix*. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract: Springer Science+Business Media New York*; 1994. p. 185-201.
  47. Jacobson DL, Peralta L, Graham NM, Zenilman J. Histologic development of cervical ectopy: relationship to reproductive hormones. *Sexually transmitted diseases*. 2000;27(5):252-8.
  48. Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, et al. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer research*. 2006;66(2):1218-24.
  49. Bappa L, Yakasai I. *Colposcopy: The scientific basis*. 2013;12(2):86-9.
  50. Turyk M, Golub T, Wood N, Hawkins J, Wilbanks G. Growth and characterization of epithelial cells from normal human uterine ectocervix and endocervix. *In vitro cellular & developmental biology*. 1989;25(6):544-56.
  51. Sun Q, Tsutsumi K, Kelleher MB, Pater A, Pater MM. Squamous metaplasia of normal and carcinoma in situ of HPV 16-immortalized human endocervical cells. *Cancer research*. 1992;52(15):4254-60.
  52. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(26):10516-21.
  53. Mukonoweshuro P, Oriowolo A, Smith M. Audit of the histological definition of cervical transformation zone. *Journal of clinical pathology*. 2005;58(6):671.
  54. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology*. 1999;189(1):12-9.
  55. Munoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*. 2004;111(2):278-85.
  56. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(6):518-27.
  57. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(11):796-802.

58. Clifford G, Smith J, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2003;88(1):63-73.
59. Bosch F, Muñoz N, De Sanjosé S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, et al. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 1993;2(5):415-22.
60. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ (Clinical research ed)*. 2002;325(7364):572.
61. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(7):423-8.
62. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau M-C, Désy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *Journal of Infectious Diseases*. 1999;180(5):1415-23.
63. Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *International journal of cancer*. 2003;106(3):396-403.
64. Clifford G, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders P, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *The Lancet*. 2005;366(9490):991-8.
65. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama*. 2007;297(8):813-9.
66. Bernard H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of clinical virology*. 2005;32:1-6.
67. Scheurer M, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2005;15(5):727-46.
68. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*. 2001;164(7):1017-25.
69. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(9):690-8.
70. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*. 2004;78(21):11451-60.
71. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
72. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*. 2006;110:525-41.
73. Munoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24:S1-S10.
74. Coggin JR, zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer research*. 1979;39(2 Part 1):545-6.
75. Laimins L. The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infectious agents and disease*. 1993;2(2):74-86.

76. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology*. 2011;19(1):33-9.
77. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24:S52-S61.
78. Chan JK, Berek JS. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(20):2975-82.
79. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(8):550-60.
80. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature medicine*. 2007;13(7):857-61.
81. Patterson NA, Smith JL, Ozbun MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *Journal of virology*. 2005;79(11):6838-47.
82. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *Journal of virology*. 2003;77(24):13125-35.
83. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the  $\alpha 6$  integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999;261(2):271-9.
84. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan N. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of virology*. 1997;71(3):2449-56.
85. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*. 2005;32:7-15.
86. Stubenrauch F, Laimins LA, editors. *Human papillomavirus life cycle: active and latent phases*. Seminars in cancer biology; 1999: Elsevier.
87. World Cancer Report 2014. Stewart BW, Wild CP, editors. Lyon: World Health Organization; 2014.
88. Kataja V, Syrjänen S, Yliskoski M, Hippeläinen M, Väyrynen M, Saarikoski S, et al. Risk factors associated with cervical human papillomavirus infections: a case-control study. *American journal of epidemiology*. 1993;138(9):735-45.
89. BAUER HM, HILDESHEIM A, SCHIFFMAN MH, GLASS AG, RUSH BB, SCOTT DR, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sexually transmitted diseases*. 1993;20(5):274-8.
90. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;174(4):679-89.
91. Kahn JA, Rosenthal SL, Succop PA, Ho GY, Burk RD. Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection. *Pediatrics*. 2002;109(1):e5-e.
92. De González AB, Sweetland S, Green J. Comparison of risk factors for squamous cell and adenocarcinomas of the cervix: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2004;90(9):1787-91.
93. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*. 2002;359(9312):1085-92.
94. Berry G, Maclennan R, Shearman R, Jelihovsky T, Booth JC, Molina R, et al. Invasive squamous-cell cervical carcinoma and combined oral contraceptives: Results from a multinational study. *International Journal of Cancer*. 1993;55(2):228-36.
95. Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. 1995;76(S10):1888-901.

96. Pater A, Bayatpour M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990;162(4):1099-103.
97. Auburn KJ, Woodworth C, Dipaolo JA, Bradlow HL. The interaction between HPV infection and estrogen metabolism in cervical carcinogenesis. *International journal of cancer*. 1991;49(6):867-9.
98. Monsonego J, Magdelenat H, Catalan F, Coscas Y, Zerat L, Sastre X. Estrogen and progesterone receptors in cervical human papillomavirus related lesions. *International journal of cancer*. 1991;48(4):533-9.
99. Rajkumar T, Appleby P, Beral V, Berrington D, Bull D, Crossley B, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies-International collaboration of epidemiological studies of cervical cancer. *International journal of cancer*. 2006;118(6):1481-95.
100. Winkelstein Jr W. Smoking and cervical cancer--current status: a review. *AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY*. 1990;131(6):945-57.
101. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, et al. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *American journal of epidemiology*. 2009;169(4):480-8.
102. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes & Control*. 2003;14(9):805-14.
103. Kjellberg L, Hallmans G, Åhren A, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *British journal of cancer*. 2000;82(7):1332.
104. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *The Lancet*. 2002;359(9312):1093-101.
105. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus research*. 2002;89(2):191-9.
106. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegne AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *British journal of cancer*. 1996;74(3):488-90.
107. Sethi S, Müller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, et al. Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;178(2):360-4.
108. Sun X-W, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright Jr TC. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *New England Journal of Medicine*. 1997;337(19):1343-9.
109. La Ruche G, You B, Mensah-Ado I, Bergeron C, Montcho C, Ramon R, et al. Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections: relation with cervical dysplasia-neoplasia in African women. *International journal of cancer*. 1998;76(4):480-6.
110. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikäheimo I, et al. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *Jama*. 2001;285(1):47-51.
111. Schiff M, Miller J, Masuk M, van Asselt King L, Altobelli KK, Wheeler CM, et al. Contraceptive and reproductive risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in American Indian women. *International journal of epidemiology*. 2000;29(6):983-90.

112. HILDESHEIM A, GRAVITT P, SCHIFFMAN MH, KURMAN RJ, BARNES W, JONES S, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-income women in Washington, DC. *Sexually transmitted diseases*. 1993;20(5):279-85.
113. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(5):368-83.
114. Elson DA, Riley RR, Lacey A, Thordarson G, Talamantes FJ, Arbeit JM. Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis. *Cancer research*. 2000;60(5):1267-75.
115. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *International journal of cancer*. 2002;97(5):654-9.
116. Giannini S, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, et al. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clinical and experimental immunology*. 1998;113:183-9.
117. MADILE BM. The Cervical Epithelium From Fetal Age to Adolescence. *Obstetrics & Gynecology*. 1976;47(5):536-9.
118. Oettling G, Kreinberg R. Cervix uteri. In: Kaufmann M, Costa S, Scharl A, editors. *Die Gynäkologie*. 2 ed: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006.
119. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS, Eakins D, Evans DM, Gradwell E, et al. Observer variation in histopathological diagnosis and grading of cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ (Clinical research ed)*. 1989;298(6675):707-10.
120. Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*. 1982;35(1):1-13.
121. Ferenczy A. Cervical intraepithelial neoplasia. In: Blaustein A, editor. *Pathology of the female genital tract*: Springer Science+Business Media New York; 1982. p. 156-77.
122. Jan P.A. Baak, Mark H. Stoler, Sarah M. Bean, Malcolm C. Anderson, Robboy SJ. Cervical precancer (intraepithelial neoplasia), including functional biomarkers and colposcopy. In: Robboy SJ, Mutter GL, Prat J, Bentley RC, Russell P, Andersson MC, editors. *Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract*. Second Edition ed: Churchill Livingstone Elsevier 2009.
123. *Histopathology Reporting in Cervical Screening—an Integrated Approach*. Sheffield; 2012. Contract No.: 10.
124. Anderson MC. Premalignant and malignant disease of the cervix. In: Fox H, editor. *Haines and Taylor, Obstetrical and Gynaecological Pathology*. 1. 3 ed. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone; 1987. p. 255-301.
125. Anderson MC. Cervical Precancer. In: Anderson MC, Symmers WSC, editors. *Systematic Pathology, Female Reproductive System*. 6. 3 ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York and Tokyo Churchill Livingstone; 1991. p. 91-103.
126. Richart RM, Wilbanks GD. The chromosomes of human intraepithelial neoplasia: Report of 14 cases of cervical intraepithelial neoplasia and review. *Cancer research*. 1966;26(1):60-74.
127. Wilbanks GD, Richart RM, Turner JY. DNA content of cervical intraepithelial neoplasia studied by two-wavelength Feulgen cytophotometry. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1967;98(6):792-9.
128. Langley FA, Crompton AC. *Recent Results in Cancer Research, Epithelial Abnormalities of the Cervix Uteri*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 1973.



129. Chi C, Rubio C, Lagerlöf B. The frequency and distribution of mitotic figures in dysplasia and carcinoma in situ. *Cancer*. 1977;39(3):1218-23.
130. Anderson M, Brown C, Buckley C, Fox H, Jenkins D, Lowe D, et al. Current views on cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of clinical pathology*. 1991;44(12):969.
131. Wilson G. How should we grade CIN? *Histopathology*. 2002;40(4):380-5.
132. Van Leeuwen A, Burger P, Pieters W, Hollema H. Atypical mitotic figures and the mitotic index in cervical intraepithelial neoplasia. *Virchows Archiv*. 1995;427(2):139-44.
133. Robertson A, Anderson J, Beck JS, Burnett R, Howatson S, Lee F, et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(3):231-8.
134. Robertson A. Histopathological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)—is there a need for change? *The Journal of pathology*. 1989;159(4):273-5.
135. McCluggage W. Endocervical glandular lesions: controversial aspects and ancillary techniques. *Journal of clinical pathology*. 2003;56(3):164-73.
136. El-GHOBASHY A, Shaaban A, Herod J, Herrington C. The pathology and management of endocervical glandular neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2005;15(4):583-92.
137. Kurian K, Al-Nafussi A. Relation of cervical glandular intraepithelial neoplasia to microinvasive and invasive adenocarcinoma of the uterine cervix: a study of 121 cases. *Journal of clinical pathology*. 1999;52(2):112-7.
138. Arends M, Buckley C, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *Journal of clinical pathology*. 1998;51(2):96-103.
139. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *International journal of cancer*. 1998;75(4):536-45.
140. Wells M, Östör AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M, Nesland JM, et al. Tumours of the Uterine Cervix. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003. p. 259-86.
141. Schmidt D, Horn L-C, Kommoss F. Histopathologie des Plattenepithelkarzinoms und des Adenokarzinoms der Cervix uteri. *Der Pathologe*. 2005;26(4):255-61.
142. Wright TC, Ferenczy A, Kurman RJ. Carcinoma and other tumors of the cervix. *Blaustein's pathology of the female genital tract: Springer*; 1994. p. 279-326.
143. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*. 1995;76(S10):1902-13.
144. Smith-McCune K, Zhu Y, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice. *Cancer research*. 1997;57(7):1294-300.
145. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(1):11-22.
146. Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2000;43(2):352-62.
147. Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecologic Pathology*. 1993;12(2):186.
148. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*. 1991;10(13):4129.
149. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(2):775-84.

150. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(7):2563-7.
151. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.
152. Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München. [Available from: <http://www.pathologie.med.uni-muenchen.de/010diagnostik/030immunhisto/index.html>.
153. Pathologisches Institut Julius-Maximilians-Universität Würzburg. [Available from: <http://www.pathologie.uni-wuerzburg.de/diagnostik/immunhistochemie/>.
154. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1 ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag München, Jena; 2000.
155. Kuhn C. *Immunhistochemie*. Frauenklinik Innenstadt der LMU München, Forschung: Prof. Jeschke; 2010.
156. [Available from: [http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/#Die\\_Avidin-Biotin-Methoden](http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/#Die_Avidin-Biotin-Methoden).
157. Osterwald E. *Immunhistochemie kompakt, Eine Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Theorie und Praxis*.
158. Systems Z. ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit. Zytomed Systems; 2013. Contract No.: DB\_POLHRP-006\_100.
159. [Available from: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1223/isotyp-kontrollantikoerper/>.
160. Institut für Pathologie Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte Berlin. [Available from: [http://pathologie-ccm.charite.de/fileadmin/user\\_upload/microsites/m\\_cc05/pathologie-ccm/Diagnostik/Diagnostik\\_Mammopathologie/mamma\\_Histologie/IRS.pdf](http://pathologie-ccm.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/m_cc05/pathologie-ccm/Diagnostik/Diagnostik_Mammopathologie/mamma_Histologie/IRS.pdf).
161. Remmele W, Stegner H. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*. 1987;8(3):138.
162. Shai A, Brake T, Somoza C, Lambert PF. The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer research*. 2007;67(4):1626-35.
163. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335-44.
164. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):355-66.
165. Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP. Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*. 1997;91(1):59-69.
166. Malumbres M, Barbacid M. Milestones in cell division: to cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(3):222-31.
167. Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*. 1994;79(4):547-50.
168. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*. 1991;65(4):701-13.
169. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246(4930):603.
170. Israels E, Israels L. The cell cycle. *The oncologist*. 2000;5(6):510-3.
171. You Z, Bailis JM. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends in cell biology*. 2010;20(7):402-9.

172. King K, Cidlowski J. Cell cycle regulation and apoptosis 1. *Annual Review of Physiology*. 1998;60(1):601-17.
173. Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*. 1995;267(5202):1353.
174. Cliby WA, Roberts CJ, Cimprich KA, Stringer CM, Lamb JR, Schreiber SL, et al. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *The EMBO journal*. 1998;17(1):159-69.
175. Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair*. 2004;3(8):997-1007.
176. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 1996;274(5293):1664-72.
177. Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*. 1994;79(2):181-4.
178. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*. 1997;88(3):323-31.
179. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
180. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433-9.
181. Hainaut P, Hollstein M. p 53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Advances in cancer research*. 1999;77:81-137.
182. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7873-82.
183. Kim KY, Wang D-H, Campbell M, Huerta SB, Shevchenko B, Izumiya C, et al. PRMT4-mediated arginine methylation negatively regulates retinoblastoma tumor suppressor protein and promotes E2F-1 dissociation. *Molecular and cellular biology*. 2015;35(1):238-48.
184. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development*. 1998;12(15):2245-62.
185. Taya Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(1):14-7.
186. Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. 1992.
187. Graana X, Garriga J, Mayol X. Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*. 1998;17:3365-83.
188. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991;65(6):1053-61.
189. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*. 1989;58(6):1097-105.
190. Chen P-L, Scully P, Shew J-Y, Wang JY, Lee W-H. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell*. 1989;58(6):1193-8.
191. Ludlow JW, Shon J, Pipas JM, Livingston DM, DeCaprio JA. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell*. 1990;60(3):387-96.
192. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell*. 1989;58(6):1085-95.
193. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(7):547-66.
194. Collier HA. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(8):667-70.

195. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development*. 2000;14(19):2393-409.
196. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *nature*. 1993;366(6456):704-7.
197. Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. 1995.
198. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes and development*. 1995;9(10):1149-63.
199. Haber DA. Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19 ARF. *Cell*. 1997;91(5):555-8.
200. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer research*. 1994;54(23):6078-82.
201. Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T, et al. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: An immunohistochemical study. *International journal of cancer*. 1996;65(4):442-5.
202. Otterson GA, Kratzke R, Coxon A, Kim YW, Kaye F. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*. 1994;9(11):3375-8.
203. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, et al. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(23):11045-9.
204. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer research*. 1994;54(22):5816-20.
205. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *The EMBO Journal*. 1995;14(3):503.
206. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveetil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. *Cancer research*. 1995;55(3):493-7.
207. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer research*. 1995;55(3):505-9.
208. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001;20(54):7874-87.
209. Cole S, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *Journal of molecular biology*. 1987;193(4):599-608.
210. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of virology*. 1989;63(3):1404-7.
211. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999;18(53):7690-700.
212. Grossman S, Laimins L. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene*. 1989;4(9):1089-93.
213. Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*. 1999;286(5443):1321-6.
214. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry*. 1992;61(1):761-807.
215. Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annual review of genetics*. 1992;26(1):179-207.

216. Huibregtse J, Scheffner M, Howley P. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(8):4918-27.
217. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 1998;17(23):2943-54.
218. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology*. 1999;80(6):1513-7.
219. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*. 2007;98(10):1505-11.
220. Garnett T, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(11):1915-26.
221. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. 1996.
222. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of virology*. 2001;75(9):4467-72.
223. Allsopp RC, Harley CB. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental cell research*. 1995;219(1):130-6.
224. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes & development*. 2004;18(18):2269-82.
225. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013;445(1):138-68.
226. Rawls J, Pusztai R, Green M. Chemical synthesis of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein: autonomous protein domains for induction of cellular DNA synthesis and for trans activation. *Journal of virology*. 1990;64(12):6121-9.
227. Yim E-K, Park J-S. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. 2005;37(6):319.
228. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps W, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(10):4549-53.
229. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(5):373-82.
230. Morozov A, Shiyanov P, Barr E, Leiden JM, Raychaudhuri P. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1 arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. *Journal of virology*. 1997;71(5):3451-7.
231. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996;13(11):2323-30.
232. Jones DL, Münger K, editors. *Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators*. Seminars in cancer biology; 1996: Elsevier.
233. Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & development*. 1997;11(16):2101-11.
234. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & development*. 1997;11(16):2090-100.

235. Kim YT, Choi EK, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW, et al. Expression of cyclin E and p27 KIP1 in cervical carcinoma. *Cancer letters*. 2000;153(1):41-50.
236. MCINTYRE MC, RUESCH MN, LAIMINS LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology*. 1996;215(1):73-82.
237. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of virology*. 1995;69(10):6389-99.
238. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:20807-.
239. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002;1572(2):209-31.
240. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005;10(2):267-75.
241. Barondes S, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76:597-8.
242. Cummings RD, Fu-Tong L. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p. 475-89.
243. Krześlak A, Lipińska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*. 2004;9(2):305-28.
244. Kuwabara I, Liu F-T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *The Journal of Immunology*. 1996;156(10):3939-44.
245. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *The Journal of Immunology*. 2000;165(4):2156-64.
246. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):899-909.
247. Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu F-T, Rabinovich GA, et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*. 2004;172(1):493-502.
248. Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(33):34922-30.
249. Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brûle F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene*. 2004;23(45):7527-36.
250. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of  $\beta$ -catenin. *Cancer research*. 2004;64(18):6363-7.
251. Okaichi K, Nose K, Kotake T, Izumi N, Kudo T. Phosphorylation of p53 modifies sensitivity to ionizing radiation. *Anticancer research*. 2011;31(6):2255-8.
252. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 1989;342(6250):705-8.
253. Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale A, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-65.

254. Klug SJ, Rensing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM, et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. *The lancet oncology*. 2009;10(8):772-84.
255. Sonoyama T, Sakai A, Mita Y, Yasuda Y, Kawamoto H, Yagi T, et al. TP53 codon 72 polymorphism is associated with pancreatic cancer risk in males, smokers and drinkers. *Molecular medicine reports*. 2011;4(3):489-95.
256. Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, Abdulaziz Z, Rafeek M, Akil N, et al. P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women. *Medical oncology*. 2011;28(3):709-15.
257. Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(10):793-805.
258. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(24):13777-82.
259. Wade M, Wong ET, Tang M, Stommel JM, Wahl GM. Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(44):33036-44.
260. Lee J-W, Song SY, Choi J-J, Choi CH, Kim T-J, Kim J, et al. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2006;132(4):241-7.
261. Kim S-s, Cho H-y, Kang S-w, Kim H-b, Park S-h. Is the expression of p16INK4A and galectin-3 correlated with disease progression of cervical neoplasia? *Korean Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2011;54(4):192-8.
262. Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, de Kroon CD, Gorter A, Jordanova ES. Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. *PloS one*. 2015;10(6):e0129119.
263. ZHOU Y-q, ZHOU X-k, KONG Y-y, SONG C-y, WU X-h. Expression of galectin-3 in cervical cancer and its clinical significance. *Tumor*. 2011;31(2):148-53.
264. Wang W, Guo H, Geng J, Zheng X, Wei H, Sun R, et al. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(48):33311-9.
265. Liu J, Cheng Y, He M, Yao S. Vascular endothelial growth factor C enhances cervical cancer cell invasiveness via upregulation of galectin-3 protein. *Gynecological Endocrinology*. 2014;30(6):461-5.



## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (2): Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)	S.003
Abbildung 2 (2): Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010	S.004
Abbildung 3 (2): Relative Überlebensrate bis 5 Jahre nach Erstdiagnose, ICD-10 C53, Deutschland 2009-2010	S.005
Abbildung 4 (45) S.247: Uterus und Tubae uterinae: Form und Aufbau	S.006
Abbildung 5 (43) S.19: Frontalschnitt durch den Uterus	S.006
Abbildung 6 (52): A: Position von Endozervix (Endocervix), Ektozervix (Ectocervix) und „Squamocolumnar junction“ auf der Zervix B: histologische Darstellung der Epithelien im Bereich der Ektozervix (Ectocervix) (Plattenepithelzellen) (squamous), der Endozervix (Endocervix) (Zylinderepithelzellen) (columnar) und der Kontaktstelle (Junction)	S.007
Abbildung 7 (64): Prozentualer Anteil unterschiedlicher HPV-Typen an der Gesamtzahl der betrachteten HPV-Infektionen in verschiedenen Regionen	S.011
Abbildung 8 (70): Schematische Darstellung des Genoms des HPV-Typs 16 mit der LCR, den frühen (E1, E2, E4, E5, E6,E7) und den späten Genen (L1, L2)	S.013
Abbildung 9 (71): Stammbaum der Papillomaviren	S.015
Abbildung 10 (106): Sichtbarkeit der Transformationszone (women with	S.023

visible transformation zone) in Abhängigkeit von Alter  
(Age) und Anzahl der Geburten (Number of livebirths)

Abbildung 11 (118) S.330: Altersabhängige Lokalisation der Transformations-	S.023
zone a) in der Pubertät, b) beim Einsetzen der	
Geschlechtsreife, c) postmenopausal	
Abbildung 12 (154) S.1: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls	S.038
Abbildung 13 (156): Schematische Darstellung der ABC-Methode	S.041
Abbildung 14a: T1-Karzinom mit schwacher Expression von E6	S.048
im Zytoplasma	
Abbildung 14b: T2-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im	S.049
Zytoplasma	
Abbildung 14c: T3-Karzinom mit mäßiger E6-Expression im	S.049
Zytoplasma	
Abbildung 14d: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen	S.050
E6-Expression lag bei Karzinomen mit T1-Status	
bei 2, bei Karzinomen mit T2-und T3-Status bei 3	
Abbildung 15a: FIGO 1-Karzinom mit schwacher E6-Expression	S.051
im Zytoplasma	
Abbildung 15b: FIGO 2-Karzinom mit mäßiger E6-Expression	S.051
im Zytoplasma	
Abbildung 15c: FIGO 3-Karzinom mit mäßiger E6-Expression	S.052
im Zytoplasma	
Abbildung 15d: FIGO 4-Karzinom mit starker E6-Expression	S.052
im Zytoplasma	
Abbildung 15e: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression	S.053
von E6 lag für FIGO 1-Karzinome bei 2, für FIGO 2-und	
FIGO 3-Karzinome bei 4 und für FIGO 4-Karzinome bei 6	

Abbildung 16a: Plattenepithelkarzinom mit geringer E6-Expression im Zytoplasma	S.054
Abbildung 16b: Adenokarzinom mit deutlicher E6-Expression im Zytoplasma	S.055
Abbildung 16c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von E6 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 2, bei Adeno- karzinomen bei 5	S.055
Abbildung 17a: Plattenepithelkarzinom mit schwacher Expression von p53 im Kern	S.056
Abbildung 17b: Adenokarzinom mit sehr schwacher Expression von p53 im Kern	S.057
Abbildung 17c: Boxplot: der mittlere IRS der nukleären Expression von p53 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 1, bei Adenokarzinomen bei 0	S.057
Abbildung 18a: Plattenepithelkarzinom mit mäßiger Expression von p53 im Zytoplasma	S.058
Abbildung 18b: Adenokarzinom mit sehr schwacher Expression von p53 im Zytoplasma	S.059
Abbildung 18c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von p53 lag bei Plattenepithelkarzinomen bei 3, bei Adenokarzinomen bei 0	S.059
Abbildung 19: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine nukleäre Expression der mutierten Form von p53, rot: nukleäre Expression der mutierten Form von p53. Es zeigte sich ein Überlebensvorteil für die Patientinnen, deren Tumore die mutierte Form von p53 im Nukleus exprimierten.	S.060

Abbildung 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine zytoplasmatische Expression der mutierten Form von p53, rot: zytoplasmatische Expression der mutierten Form von p53. Es zeigte sich, dass die Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma der Tumore keinen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen hatte.	S.061
Abbildung 21a: Plattenepithelkarzinom mit mittlerer Expression der mutierten Form von p53 im Nukleus	S.062
Abbildung 21b: Adenokarzinom mit schwacher Expression der mutierten Form von p53 im Nukleus	S.063
Abbildung 21c: Boxplot: der mittlere IRS der nukleären Expression der mutierten Form von p53 lag beim Plattenepithelkarzinom und beim Adenokarzinom bei 0	S.063
Abbildung 22a: Plattenepithelkarzinom mit starker p16-Expression im Zytoplasma	S.064
Abbildung 22b: Adenokarzinom mit mäßiger p16-Expression im Zytoplasma	S.065
Abbildung 22c: Boxplot: der mittlere IRS der zytoplasmatischen Expression von p16 lag beim Plattenepithelkarzinom bei 6, beim Adenokarzinom bei 4	S.065
Abbildung 23a: Adenokarzinom: schwache Expression von MDM2 im Kern	S.067
Abbildung 23b: Adenokarzinom: schwache Expression von gal-3 im Zytoplasma	S.067
Abbildung 23c: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von MDM2 im Kern	S.068
Abbildung 23d: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von gal-3 im Zytoplasma	S.068
Abbildung 24a: Plattenepithelkarzinom: schwache Expression von E6 im Zytoplasma	S.070

Abbildung 24b: Plattenepithelkarzinom: starke Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma	S.070
Abbildung 24c: Plattenepithelkarzinom: starke Expression von E6 im Zytoplasma	S.071
Abbildung 24d: Plattenepithelkarzinom: schwache Expression der mutierten Form von p53 im Zytoplasma	S.071
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: schwarz: keine Expression von gal-3 bei p16-negativen Patientinnen im Zytoplasma, rot: Expression von gal-3 bei p16-negativen Patientinnen im Zytoplasma. Es zeigte sich, dass p16-negative Patientinnen, die gal-3 im Zytoplasma ihrer Tumore exprimierten, einen Überlebensnachteil gegenüber p16-negativen Patientinnen, deren Tumore keine gal-3-Expression im Zytoplasma zeigten, hatten.	S.072
Abbildung 26 (200): Regulatorische Rückkopplungsschleife TF: transcription factor (Transkriptionsfaktor), Cyc D: cyclin D (ZyklinD)	S.077

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 (64):	Altersverteilung, roh-und altersstandardisierte HPV- Prävalenz der Frauen ohne zervikale Auffälligkeiten bei den von der Agentur für Krebsforschung („Agency for Research on Cancer“, IARC) durchgeführten Erhebungen, je nach Untersuchungsgebiet	S.010
Tabelle 2 (124) S.270:	Histologische Kennzeichen der CIN	S.025
Tabelle 3 (140) S.260:	Histologische Klassifikation der Tumor der Cervix uteri nach der WHO	S.027
Tabelle 4 modifiziert nach (147):	Natürlicher Verlauf einer CIN, Zusammenfassung	S.030
Tabelle 5:	klinische Merkmale des Patientenkollektivs; NV: nicht verfügbar	S.033
Tabelle 6:	verwendete Primärantikörper	S.037
Tabelle 7:	Färbeprotokoll für die Primärantikörper p53, mutierte Form von p53 und E6	S.044
Tabelle 8:	Färbeprotokoll für die Primärantikörper MDM2 und Galektin-3	S.045
Tabelle 9 (160):	Schema der Wertevergabe für Farbintensität und Anteil positiver Tumorzellen bei dem IRS Score	S.047

## 12. Veröffentlichungen und Kongressbeitrag

### Veröffentlichungen:

1. Annika Stiasny, Christina Kuhn, Doris Mayr, Christoph Alexiou, Christina Janko, Irmi Wiest, Udo Jeschke, Bernd Kost: Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoprotein Staining in Cervical Cancer, Anticancer Research 36: 3195-3198 (2016)
2. Christoph P. Freier, Annika Stiasny, Christina Kuhn, Doris Mayr, Christoph Alexiou, Christina Janko, Udo Jeschke, Bernd Kost: Immunhistochemical Evaluation of the Role of p53 Mutant in Cervical Cancer: Ser-20 p53-Mutant Correlates with Better Prognosis, Anticancer Research 36: 3131-3138 (2016)
3. Annika Stiasny, Christoph P. Freier, Christina Kuhn, Sandra Schulze, Doris Mayr, Christoph Alexiou, Christina Janko, Irmi Wiest, Christian Dannecker, Udo Jeschke, Bernd Kost: The involvement of E6, p53, p16, MDM2 and Gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer Oncology Letters 14: 4467-4476 (2017)

### Kongressbeitrag:

19. bis 21. Oktober: 16. Hamburger Symposium über Tumormarker  
„Evaluierung einer immunhistochemischen Färbung zum direkten  
Nachweis von E6/E7-Onkoprotein an Zervix-und Larynxkarzinomen“



## 13. Lebenslauf



## 14. Danksagung

Der größte Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke. Ich möchte mich von ganzem Herzen für das Vertrauen, das er in mich setzte, die Chance, die er mir gab und das Verständnis, das er mir entgegenbrachte, bedanken. Seiner stets mehr als geduldigen und bereitwilligen Hilfe konnte ich mir wirklich immer sicher sein, was ich als außergewöhnlich empfinde. Er verlangte nie etwas von mir, zu dem ich nicht in der Lage war und indem er an mich glaubte, half er mir, auch selbst an mich zu glauben.

Nicht nur mein Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke brachte mir dieses Wohlwollen entgegen, sondern in genauso großem Maß auch die medizinisch technischen Assistentinnen Christina Kuhn, Simone Hofmann, Sandra Schulze und Irmi Wiest. Sie erklärten mir mit sehr viel Geduld und Freundlichkeit die Abläufe einer immunhistochemischen Färbung, stellten enorme Zahlen an Gewebsschnitten her, erarbeiteten unermüdlich Färbeprotokolle, unterstützen mich bei der Anfertigung meines Vortrags, verlangten nur für mich Mögliches und niemals Unmögliches und halfen mit einfach immer und bei allem wenn es notwendig war. Ohne sie hätte ich keine brauchbaren Ergebnisse liefern können und diese Arbeit wäre sicherlich nicht so geworden, wie sie jetzt ist. An allererster Stelle ist hierbei Christina Kuhn zu erwähnen.

Bei meinem medizinischen Betreuer Dr. Bernd Kost möchte ich mich sehr für seine Unterstützung bedanken.

Dank gebührt auch Frau Prof. Dr. Doris Mayr, die als Pathologin bei der Erarbeitung der Färbeprotokolle beratend zur Seite stand und deren Institut (Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München) die Färbung der Schnitte mit dem p16-Primärankörper mittels Färbeautomat übernahm.

Außerdem will ich mich von ganzem Herzen bei Dr. Dr. Christoph Freier für die Anfertigung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven und sonstige Hilfestellungen bedanken.

Bei Laurent Soussana bedanke ich mich sehr für die sprachliche Korrektur der Paper, die er als Kanadier immer gern und schnell erledigte.

Zu der wunderbaren Atmosphäre in der Arbeitsgruppe trugen natürlich die „Stammbesetzung“ bestehend aus Prof. Dr. Udo Jeschke, Christina Kuhn, Simone Hofmann, Sandra Schulze und Irmi Wiest in großem Umfang bei, aber auch die Doktoranden, die ich in meiner Zeit dort kennenlernte, hatten einen Anteil daran. Dankeschön an:

Elif Akyol, Amelie Birk, Christoph Freier, Cosima Kemmether, Aylin Keskin, Franziska Kraft, Katharina Müller, Jan-Niclas Mumm, Verena Nick, Sabina Page, Kristina Pfender, Theresa Vilsmaier und Xi Zhang. Mit einigen haben sich Freundschaften entwickelt, worüber ich mich sehr freue.

Ich empfinde es als großes Glück, dass der Zufall mich in diese Arbeitsgruppe führte. Ich bin immer sehr gerne ins Labor gegangen und hatte dort eine sehr schöne Zeit. Durch die trotz der vielen Arbeit herrschende gute Stimmung färbte ich mein Panel gerne mit mehr Antikörpern als eigentlich geplant war. Ich durfte sehr viel lernen und neue Einblicke gewinnen, wurde gefördert, ohne überfordert zu werden, fand Hilfe wann immer ich sie brauchte, Wohlwollen, Verständnis und wurde niemals allein gelassen. Das empfinde ich als sehr großes Geschenk, wofür ich sehr dankbar bin.

Ich hoffe sehr, dass die geschlossenen Freundschaften bestehen bleiben und der Kontakt auch zukünftig erhalten bleiben wird.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich dafür bedanken, dass sie meine manchmal schlechte Laune während des Schreibprozesses ertrugen, Verständnis dafür hatten, dass ich wenig Zeit für sie hatte, sich mein Sorgen diesbezüglich anhörten und mir Mut zusprachen.

Danke.

## 15. Eidesstattliche Versicherung

Stiasny, Annika Barbara Amelie

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Rolle von E6-Onkoprotein, p53, p53 mutiert, p16, MDM2 und Galektin-3  
beim Zervixkarzinom“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berg, 25.05.2018

Annika Barbara Amelie Stiasny